

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, BIOLOGÍA CELULAR,
HISTOLOGÍA, HISTORIA DE LA CIENCIA, MEDICINA LEGAL Y FORENSE Y
TOXICOLOGÍA
Área de Toxicología



**CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS PRESENTES EN CEREBRO Y
MÚSCULO DE DORADA (*Sparus aurata*) Y ESTUDIO DE SU INHIBICIÓN POR
INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la UCA dentro del programa:
Recursos Naturales y Medio Ambiente

Presentada por:
María Gemma Albendín García

Cádiz, 2009

Dña. M^a ISABEL ARUFE MARTÍNEZ, Profesora Titular del área de Toxicología del Departamento de Anatomía Patológica, Biología Celular, Histología, Historia de la Ciencia, Medicina Legal y Forense y Toxicología de la Facultad de Medicina y D. MANUEL PEDRO MÁNUEL VEZ, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz.

INFORMAN: que la licenciada en Ciencias del Mar y alumna de tercer ciclo del programa de Doctorado de Recursos Naturales y Medio Ambiente **Dña. María Gemma Albendín García**, ha realizado en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales del Departamento de Anatomía Patológica, Biología Celular, Histología, Historia de la Ciencia, Medicina Legal y Forense y Toxicología de la Universidad de Cádiz, el trabajo titulado “**Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de dorada (*Sparus aurata*) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados**” bajo nuestra dirección y que presenta para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos la presente en Puerto Real a catorce de abril de 2009:

Fdo. Dra. M^a Isabel Arufe Martínez

Fdo. Dr. Manuel Pedro Mánuel Vez

El presente trabajo se enmarca dentro del Proyecto de Investigación titulado **“Caracterización bioquímica, localización histoenzimática e inmunohistoquímica de colinesterasas blanco de compuestos organofosforados y estudio de enzimas detoxificadoras de estos compuestos en *Sparus aurata*”** financiado por el Plan Nacional I+D, Ministerio de Ciencia y Tecnología (CTM2004-05718 TECNO).

Agradecimientos

Durante los últimos años ha habido momentos en los que pensé que este día nunca llegaría, y es posible que no lo hubiera conseguido sin la ayuda de mucha gente. Por este motivo, me gustaría expresar mi agradecimiento más sincero y profundo a todas aquellas personas que de una u otra manera han estado a mi lado en estos años, sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

En especial quiero agradecer a Dña. M^a Isabel Arufe Martínez, directora de esta tesis, por su ánimo y dedicación, por sus consejos siempre útiles y su paciencia, y sobre todo por confiar en mí para la realización de este trabajo.

A D. Manuel Pedro Manuel Vez, codirector de esta tesis, por su apoyo incondicional y sus acertados consejos, por haberme acompañado desde el inicio de esta aventura.

A D. Carlos Moreno Aguilar, por preocuparse por la marcha de este trabajo y por estar siempre disponible para la realización de cualquier tipo de consulta.

A Dña. Juana Arellano, por su ayuda durante todos estos años, sin ella esta tesis no habría sido posible. Ella ha sido un gran apoyo en los momentos más bajos, su alegría, comprensión, paciencia y amistad han sido vitales para alcanzar la meta.

A mis compañeros Dña. Carolina Mendiguchia y D. Juan José Pinto Ganfornina, por su acogida cálida en los inicios, por su entrañable amistad y sabios consejos. Siempre recordaré con infinito cariño los cafelitos y las comidas, momentos únicos que han contribuido a crear un agradable ambiente de trabajo durante estos años.

Las intensas horas de trabajo convierten a las personas que te rodean en tu segunda familia, comparten cada minuto de los largos días de muestreo, de medidas, de experimentos, etc. Son partícipes de tus pequeños triunfos y de tus fracasos por eso no podía dejar de agradecerles a mis compañeros Manuela, Cristina, José Antonio, Mostapha, Laura, María, Auxi y Antonio, su paciencia y cariño.

A todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias, Mariló, Estrella, Félix, Abdellah y Clara, así como al resto de integrantes del grupo de Investigación de Geoquímica Marina, los profesores Dolores Galindo, Pilar Martínez y Manolo García-Vargas.

A los compañeros del Laboratorio de Cultivos de la Universidad de Cádiz, Rosa, Mariano, Ana, Charo y Maite por su inestimable ayuda y amabilidad.

A Dña. Carmen Sarasquete, Directora del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), por haber puesto a nuestra disposición las instalaciones del centro.

A D. Luís Navarrete, Catedrático de la Universidad de Granada, por su gran ayuda en el difícil camino de la estadística, apoyo y ánimo.

A mi hermano Luís, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por escucharme aunque la mitad de las veces no entienda de que le estoy hablando. A mi abuela, por su cariño y afecto. A Juanjo, por entender mi peculiar forma de ver la vida y por haber estado a mi lado. Y por supuesto, a mis padres, ellos han sufrido y se han alegrado tanto o más que yo, con los retrocesos y los avances experimentados durante estos años, sin ellos estoy segura que no lo hubiera logrado.

No podría acabar estas líneas sin acordarme de mis amigos, especialmente de M^a José por estar siempre ahí, por aguantar mis quejas y lamentos. Ella ha sido y siempre será mi mejor apoyo. A Elena, Iván y Esther por todos los maravillosos e irrepetibles momentos vividos. A mis amigos de siempre, Belén, Consuelo, Antonio R, Enrique, José M, Alex y a los que he encontrado durante todos estos años, Ana, Nathalie, Juana, Bea, Mar, Jessica, Sonia, Pepa, Quina, Lola, Begoña, Rachel, Mila, Valle, Jero, Rojo, Antonio, por los buenos ratos pasados y los que están por llegar.

Y finalmente, a todas aquellas personas que hicieron de estos años en Cádiz una de las etapas más bellas e interesantes de mi vida.

Gracias.

À mis padres

Abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterasa

ASCh: Acetiltilocolina

AZO: Azinfosmetil-oxón

A β SCh: Acetil-beta-metiltiocolina

BChE: Butirilcolinesterasa

BSCh: Butiriltiocolina

ChE: Colinesterasa/s

COPIND: Desorden crónico neuropsiquiátrico inducido por organofosforados

DCV: Diclorvos

E: Edad

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FC: Factor de condición

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

ISC: Índice somático cerebral

ISH: Índice hepatosomático

L: Longitud corporal

NTE: Esterasa diana de neuropatía

OF: Compuesto/s organofosforado/s

OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud

OMT: Ometoato

OPIDN: Neuropatía retardada inducida por organofosforados

P: Peso corporal

P_c: Peso cerebral

PChE: Propionilcolinesterasa

P_h: Peso hígado

PRO: Paraoxón

PSCh: Propioniltiocolina

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	1
1. 1. 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. 1. 2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	4
1. 1. 3. TOXICOCINÉTICA.....	7
1. 1. 3. 1. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y EXCRECIÓN.....	7
1. 1. 3. 2. BIOTRANSFORMACIÓN.....	7
1. 1. 4. MECANISMO DE ACCIÓN	11
1. 1. 5. TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	14
1. 1. 5. 1. TOXICIDAD AGUDA.....	14
1. 1. 5. 1. 1. Crisis aguda colinérgica.....	14
1. 1. 5. 1. 2. Neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN)	15
1. 1. 5. 1. 3. Síndrome intermedio	16
1. 1. 5. 2. TOXICIDAD CRÓNICA.....	16
1. 1. 5. 2. 1. Efectos sobre la reproducción	16
1. 1. 5. 2. 2. Efectos teratogénicos	17
1. 1. 5. 2. 3. Efectos mutagénicos	18
1. 1. 5. 2. 4. Efectos carcinogénicos.....	18
1. 1. 5. 2. 5. Toxicidad orgánica.....	19
1. 1. 5. 2. 6. Desorden crónico neuropsiquiátrico inducido por organofosforados (COPIND)	19
1. 1. 5. 3. TRATAMIENTO	19
1. 1. 6. EFECTOS ECOLÓGICOS	21
1. 1. 6. 1. EFECTOS SOBRE LAS AVES	21
1. 1. 6. 2. EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS	22
1. 1. 6. 3. EFECTOS SOBRE OTROS ORGANISMOS.....	23
1. 1. 7. DESTINO MEDIOAMBIENTAL	24
1. 1. 7. 1. SUELOS.....	24
1. 1. 7. 2. AGUAS.....	25
1. 1. 7. 3. VEGETACIÓN.....	26
1. 2. ORGANOFOSFORADOS OBJETO DE ESTUDIO	27
1. 2. 1. AZINFOSMETIL	29
1. 2. 1. 1. INTRODUCCIÓN	29

1. 2. 1. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS.....	29
1. 2. 1. 2. 1. Toxicidad aguda	29
1. 2. 1. 2. 2. Toxicidad crónica.....	30
1. 2. 1. 2. 3. Destino en animales y humanos	31
1. 2. 1. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS.....	31
1. 2. 1. 3. 1. Efectos sobre las aves.....	31
1. 2. 1. 3. 2. Efectos sobre organismos acuáticos.....	32
1. 2. 1. 3. 3. Efectos en otros organismos (especies no diana)	32
1. 2. 1. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL.....	33
1. 2. 1. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas	33
1. 2. 1. 4. 2. Aguas superficiales.....	33
1. 2. 1. 4. 3. Vegetación.....	34
1. 2. 2. DICLORVOS	35
1. 2. 2. 1. INTRODUCCIÓN	35
1. 2. 2. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS.....	35
1. 2. 2. 2. 1. Toxicidad aguda	35
1. 2. 2. 2. 2. Toxicidad crónica.....	36
1. 2. 2. 2. 3. Destino en animales y humanos	38
1. 2. 2. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS.....	39
1. 2. 2. 3. 1. Efectos sobre las aves.....	39
1. 2. 2. 3. 2. Efectos en organismos acuáticos.....	39
1. 2. 2. 3. 3. Efectos sobre otros organismos (especies no diana)	39
1. 2. 2. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL.....	40
1. 2. 2. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas	40
1. 2. 2. 4. 2. Aguas superficiales.....	40
1. 2. 2. 4. 3. Vegetación.....	41
1. 2. 3. DIMETOATO	41
1. 2. 3. 1. INTRODUCCIÓN	41
1. 2. 3. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS.....	41
1. 2. 3. 2. 1. Toxicidad aguda	41
1. 2. 3. 2. 2. Toxicidad crónica.....	42
1. 2. 3. 2. 3. Destino en animales y humanos	43
1. 2. 3. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS.....	44
1. 2. 3. 3. 1. Efectos sobre las aves.....	44
1. 2. 3. 3. 2. Efectos sobre organismos acuáticos.....	44
1. 2. 3. 3. 3. Efectos sobre otros organismos (especies no diana)	45

1. 2. 3. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL.....	46
1. 2. 3. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas	46
1. 2. 3. 4. 2. Aguas superficiales.....	46
1. 2. 3. 4. 3. Vegetación.....	47
1. 2. 4. PARATIÓN	48
1. 2. 4. 1. INTRODUCCIÓN	48
1. 2. 4. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS.....	48
1. 2. 4. 2. 1. Toxicidad aguda	48
1. 2. 4. 2. 2. Toxicidad crónica.....	49
1. 2. 4. 2. 3. Destino en animales y humanos	50
1. 2. 4. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS.....	50
1. 2. 4. 3. 1. Efectos sobre las aves.....	50
1. 2. 4. 3. 2. Efectos en organismos acuáticos.....	51
1. 2. 4. 3. 3. Efectos sobre otros organismos (especies no diana)	51
1. 2. 4. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL.....	51
1. 2. 4. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas	51
1. 2. 4. 4. 2. Aguas superficiales.....	52
1. 2. 4. 4. 3. Vegetación.....	52
1. 3. LAS ENZIMAS COLINESTERASAS	53
1. 3. 1. INTRODUCCIÓN.....	53
1. 3. 2. COLINESTERASAS.....	53
1. 3. 2. 1. ACETILCOLINESTERASA	57
1. 3. 2. 2. BUTIRILCOLINESTERASA	57
1. 3. 3. CARBOXILESTERASAS.....	59
1. 3. 4. ESTERASA DIANA DE NEUROPATÍA.....	59
1. 3. 5. DIVERSIDAD DE LAS COLINESTERASAS EN LOS ORGANISMOS	
ACUÁTICOS.....	60
1. 3. 6. FUENTES DE VARIACIÓN EN LA ACTIVIDAD COLINESTERASA.....	61
1. 3. 7. APLICACIONES DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA.....	69
1. 4. LA DORADA (<i>Sparus aurata</i>)	71
1. 4. 1. DESCRIPCIÓN.....	71
1. 4. 2. HABITAT Y BIOLOGÍA.....	72
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	75
CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS	79
3. 1. REACTIVOS	81
3. 2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	82

3. 3. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS	82
3. 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	86
3. 4. 1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA	86
3. 4. 2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	88
3. 5. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS	89
3. 5. 1. ESTUDIOS PRELIMINARES	89
3. 5. 2. SUSTRATOS ESPECÍFICOS Y PARÁMETROS CINÉTICOS.....	89
3. 5. 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS USANDO INHIBIDORES ESPECÍFICOS	90
3. 6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BASAL Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.....	91
3. 7. ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	92
3. 7. 1. ENSAYOS <i>in vitro</i>	92
3. 7. 1. 1. Consideraciones teóricas.....	92
3. 7. 1. 2. Procedimiento experimental	94
3. 7. 2. ESTUDIOS <i>in vivo</i>	96
3. 7. 2. 1. Ensayos preliminares dosis-respuesta	96
3. 7. 2. 2. Ensayos de recuperación de la actividad colinesterasa	99
3. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	99
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	101
4. 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS	103
4. 1. 1. ESTUDIOS PRELIMINARES	103
4. 1. 2. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO Y PARÁMETROS CINÉTICOS.....	105
4. 1. 2. 1. Especificidad de sustrato (ensayos preliminares)	105
4. 1. 2. 2. Parámetros cinéticos.....	109
4. 1. 3. EFECTO <i>in vitro</i> DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS	115
4. 1. 3. 1. Cerebro	115
4. 1. 3. 2. Músculo.....	122
4. 2. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BASAL Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS	130
4. 3. ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	147
4. 3. 1. ENSAYOS <i>in vitro</i>	147
4. 3. 2. ESTUDIOS <i>in vivo</i>	161
4. 3. 2. 1. Ensayos preliminares dosis-respuesta	161
4. 3. 2. 2. Ensayos de recuperación de la actividad colinesterasa	167

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	177
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS.....	179
5. 1. 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS UTILIZANDO INHIBIDORES ESPECÍFICOS Y PREFERENCIA DE SUSTRATO	179
5. 1. 2. PARAMETROS CINÉTICOS.....	181
5. 2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BASAL Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.....	187
5. 3. ENSAYOS DE INHIBICION CON ORGANOFOSFORADOS	189
5. 3. 1. ENSAYOS <i>in vitro</i>	189
5. 3. 2. ENSAYOS <i>in vivo</i>	200
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	209
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213
ANEXO	249

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. 1. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

1. 1. 1. INTRODUCCIÓN

Según la FAO, se considera como plaguicida o pesticida “una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (OMS, 2003).

El hombre ha hecho uso de los plaguicidas desde la antigüedad con fines muy diversos, pero no fue hasta las últimas décadas del siglo XX cuando su empleo se extendió considerablemente. Su desarrollo y aplicación en la agricultura ha sido un factor decisivo para combatir una gran variedad de plagas insectívoras y herbáceas, incrementando la producción alimenticia y mejorando la salud humana. Algunos plaguicidas se utilizan como agentes de la lucha antivectorial en los programas de salud pública encaminados al control de enfermedades. Bajo la definición de plaguicida, anteriormente indicada, se engloban numerosos productos. Por ejemplo los fungicidas (para combatir hongos), herbicidas (malas hierbas), nematocidas (gusanos), molusquicidas (caracoles y babosas), acaricidas (ácaros), insecticidas (insectos) y rodenticidas (roedores), como los más conocidos. Pero también se consideran plaguicidas otras sustancias como los reguladores del crecimiento de las plantas, los inhibidores de la germinación, los atrayentes y repelentes de plagas y los productos empleados como ectoparasitocidas en animales.

A pesar de los beneficios que la sociedad obtiene de la aplicación de los plaguicidas, no se puede olvidar que éstos son sustancias tóxicas que, si bien son capaces de eliminar a los organismos diana correspondientes, también pueden producir un impacto indeseable sobre los ecosistemas y sobre el hombre.

Los compuestos organofosforados (OF) han sustituido en gran medida a los organoclorados al considerarse inicialmente menos peligrosos para el medio ambiente. No obstante, actualmente se acepta que los OF son más peligrosos de lo que en un principio se pensaba para el medio ambiente y para los organismos no diana que en él

habitan. Por ello, hoy se aboga por el desarrollo de plaguicidas de rápida degradación medioambiental y que sean menos perjudiciales para los organismos a los que no están destinados, como los piretroides, y por la aplicación de las denominadas buenas prácticas en agricultura.

El cambio que se ha producido en nuestros gobernantes se debe, en gran medida, a que la opinión pública de los países desarrollados ha tomado conciencia de los problemas que el uso y el mal uso de estos compuestos puede provocar en el medio ambiente. La presión ejercida por la sociedad ha dado como fruto la regulación de la producción, comercialización y uso de los plaguicidas.

En consecuencia, organizaciones como la Agencia Medioambiental Americana (EPA) actualizan sus normativas a medida que los conocimientos científicos así lo requieren. El Gobierno norteamericano, desde 1993, está promoviendo la disminución del uso de plaguicidas en la agricultura mediante la instauración del control integrado de plagas (IPM). Esto consiste en la unificación de medios de control por métodos de cultivo, rotación de cosechas, el empleo de variedades fortalecidas y el uso estratégico de cantidades menores de plaguicidas para conseguir resultados iguales o mejores a los obtenidos por medio de un control exclusivamente químico.

En el ámbito de la Unión Europea existe también una renovación continua de las Directivas del Consejo que regulan la producción y comercialización de plaguicidas, así como de las que fijan límites máximos de residuos en alimentos de origen animal y vegetal. En este sentido, se entiende por residuo de plaguicida a toda sustancia presente en un producto alimenticio destinada al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida (Codex Alimentarius FAO/OMS, 1996). Hay que hacer hincapié que dicho término engloba no solo a los restos de la molécula del plaguicida en su forma original sino a todos los productos de reacción o conversión, que suelen ser sus metabolitos con significación toxicológica y las sustancias constituyentes de la formulación del plaguicida. Todo ello se traduce en la necesidad constante de actualizar las legislaciones de los países miembros de la Unión Europea y en que la industria productora de plaguicidas sea una de las más reguladas.

Los plaguicidas se suelen clasificar basándose en criterios como: *su toxicidad, su modo de acción, el tipo de aplicación y la familia química a la que pertenecen*. En la

actualidad, debido a la gran cantidad de plaguicidas existentes y de las familias químicas implicadas no resulta fácil una adecuada clasificación química. Siguiendo las directrices de la OMS, los pesticidas se pueden clasificar en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, derivados bipiridílicos, clorofenoxiácidos, cloronitrofenoles y organomercuriales, compuestos orgánicos del estaño, tiocarbamatos, ditiocarbamatos y otros como bromuro de metilo, fosfatina, ácido cianhídrico (fumigantes), sulfato de talio, fluoracetato sódico, warfarina (rodenticidas) y arsenito sódico, criolita (insecticidas inorgánicos).

Entre los compuestos nombrados anteriormente, los pesticidas OF son los más usados en todos los ámbitos de nuestra vida cotidiana. El primer organofosforado se sintetizó a finales del siglo XIX; sin embargo, hasta 1937, Schröder no definió la estructura que les confería su actividad como insecticida. Actualmente, los OF constituyen el grupo de plaguicidas más utilizados en la agricultura mundial, habiendo desplazado a los organoclorados. Este hecho se ha debido a la alta toxicidad y capacidad de bioacumulación en la cadena trófica de estos últimos (Ecobichon, 2005). Aunque los compuestos organofosforados son en principio menos peligrosos que los organoclorados se hace necesario su estudio debido a la variabilidad química de este grupo y su uso masivo, junto con la evidencia de que existen OF, como el fentión o el metilparatión, que son capaces de bioacumularse (Tsuda y col., 1996; De la Vega y col., 1997).

En cuanto a la producción de los OF, hay que resaltar que desde 1942 se han sintetizado más de 50.000 derivados. Algunos se han utilizado con fines bélicos, y al menos 50 derivados han sido comercializados como insecticidas (Gisbert y Villanueva, 1998). Los primeros compuestos actuaban por contacto y eran aplicados sobre campos agrícolas. Posteriormente, aparecieron pesticidas con propiedades sistémicas, como el dimetoato o el forato, que son capaces de penetrar en la planta y circular por su sistema vascular, permitiendo que insectos como las avispas, que se alimentan de las plantas tratadas, sean envenenados por los insecticidas o por sus metabolitos tóxicos. Otros pesticidas, como el malatión, se desarrollaron para ser más selectivos y tener una baja toxicidad para los mamíferos, de manera que podían tener otros usos, como el de proteger el grano almacenado de las plagas y para los programas de salud pública (Walker y col., 2001). En cambio, compuestos como el diclorvos (DDPV) han sido utilizados para el control de plagas domésticas y sobre el ganado. Este compuesto se administra oralmente al ganado con el fin de eliminar

parásitos (las larvas) o se aplica externamente sobre la piel o en las escamas de diversos animales para el control de ectoparásitos (Botsoglou y Fletouris, 2000; Buchmann y Bresciani, 2006).

A pesar de los innegables beneficios que estos compuestos aportan a nuestra vida, éstos pueden suponer un importante problema para el medio ambiente. La rápida extensión de su uso y la proliferación de nuevos ingredientes activos y nuevas formulaciones, junto a su elevada toxicidad aguda, han provocado problemas tanto en humanos como en otras especies. Además, se están dando casos de resistencia a estos compuestos por parte de algunos organismos como la garrapata (*Boophilus microplus*) (Schuntner y col., 1968), el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) (Forgash, 1984), la mosca del olivar (*Bactrocera olea*) (Vontas y col., 2001) o la chinche tropical (*Cimex hemipterus*) (Karunaratne y col., 2007).

1. 1. 2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Los compuestos organofosforados se definen como derivados ésteres, amidas o tioles de los ácidos fosfórico, fosfónico, fosforotioico o fosforoditioico (Cope y col., 2004). Presentan alta reactividad química y se degradan con relativa facilidad, bien mediante reacciones de hidrólisis, que dan lugar a productos inocuos para el medio ambiente, o por reacciones de oxidación, que conducen a metabolitos hidrolizables de mayor o menor toxicidad.

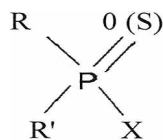


Figura 1.1. Estructura básica de un organofosforado

Estos plaguicidas se caracterizan por un átomo de fósforo pentavalente unido por un enlace simple a tres sustituyentes orgánicos (frecuentemente a través de un oxígeno) y por un enlace covalente coordinado (doble enlace) a un oxígeno o un azufre (Figura 1.1). Uno de los sustituyentes (X) se denomina “grupo saliente” debido a que está unido a través del enlace menos estable de los tres enlaces simples, y es el sustituyente que se elimina cuando el compuesto fosforila el enzima blanco o cuando el compuesto es hidrolizado o se escinde oxidativamente (Tang et al., 2006).

En total, hay al menos 13 tipos de OF (Gupta, 2007), los cuales se relacionan en la Tabla 1.1.

Basándose en la reactividad de estos compuestos con los órganos diana en el organismo, podemos clasificar a los plaguicidas organofosforados en dos grandes grupos (Maroni y col., 2000):

- **Inhibidores directos:** éstos tienen un átomo de oxígeno unido a un átomo de fósforo mediante un enlace covalente. Son altamente reactivos y no necesitan ningún tipo de activación para inhibir la actividad de la AChE. Es el caso, por ejemplo, del diclorvos.
- **Inhibidores indirectos:** poseen un átomo de azufre unido al átomo de fósforo mediante un enlace covalente coordinado (fosforotioatos, fosfonotioatos y fosforoditioatos). Necesitan la activación metabólica mediante el citocromo P-450 para ejercer su acción. Ejemplos de organofosforados que sufren dicha transformación son: azinfosmetil, dimetoato y paratión. Estos compuestos se desulfuran oxidativamente a azinfosmetil-oxón, ometoato y paraoxón, respectivamente, que son los metabolitos activos que se unen a la AChE.

Estos insecticidas son por lo general, solubles en disolventes orgánicos, especialmente en los aromáticos como benceno o xileno y menos en alifáticos como hexano y pentano. Poseen un coeficiente de partición octanol/agua muy alto además de una presión de vapor muy baja. En general, todos presentan una baja volatilidad, salvo el diclorvos.

Muchos de ellos son formulados como concentrados en aceite o emulsionables en xileno, en disolventes miscibles con agua, como el etilenglicol monometil éter, o son absorbidos sobre los gránulos de material inerte para aplicación directa o después de dispersión en agua (García-Repetto y col., 2003).

Tabla 1.1. Clasificación general de los compuestos organofosforados.

Tipo	Estructura química	Ejemplos
Fosfatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Diclorvos Monocrotofos
Fosfonatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Triclorfón
Fosfinatos	$\begin{array}{c} \text{OR} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Glufosinato
Fosforotioatos (S=)	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Paratión Fentión Clorpirifos
Fosfonotioatos (S=)	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	EPN Leptofos
Fosforotioatos (S sustituidos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Demetón-S- metil Ecotiofato
Fosfonotioatos (S sustituidos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{R} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	VX
Fosforoditioatos	$\begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{OR} \end{array} & \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \\ \text{OR} \end{array} \end{array}$	Azinfosmetil Dimetoato Malatión
Fosforotritioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \\ \text{SR} \end{array}$	DEF (tribufos)
Fosforamidatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Fenamifos
Fosforamidotioatos	$\begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \\ \text{OR} \end{array} & \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \\ \text{OR} \end{array} \end{array}$	Metamidofos Isofenfos
Fosforofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{OR} \end{array}$	Diisopropil fosforofluridatos (DFP)
Fosfonofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{OR} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{F} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Sarín Somán

1. 1. 3. TOXICOCINÉTICA

1. 1. 3. 1. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y EXCRECIÓN

La mayoría de los plaguicidas organofosforados son compuestos liposolubles que no se encuentran ionizados, y por ello son absorbidos rápidamente por ingestión o por inhalación. La absorción sobre la piel es un proceso lento, de modo que solo se produce después de una larga exposición al pesticida, y va a depender del tipo de formulación implicada, de los disolventes presentes en la misma y de factores biológicos como la especie afectada o la edad (Riviere, 2006). Si la piel presenta algún daño y/o si la temperatura es cálida, entonces la absorción es más rápida (Ferrer, 2003).

Tras la absorción, los OF se distribuyen ampliamente por el organismo del animal a través de la sangre, acumulándose en el tejido adiposo, hígado, riñones, músculo y glándulas salivares. Estos compuestos suelen mostrar cierta preferencia por los tejidos grasos, debido a la naturaleza lipofílica de gran parte de ellos, haciendo que su eliminación sea más lenta (Marrs y Vale, 2006).

Investigaciones recientes apuntan la posibilidad de que los OF sean más persistentes en los organismos de lo que se había admitido hasta el momento. Hasta hace relativamente poco se pensaba que la mayor parte de sus residuos eran eliminados transcurridas unas 48 horas desde la exposición, excepto en aquéllos de mayor liposolubilidad. Sin embargo, nuevos estudios han aportado datos sobre la permanencia de éstos en el organismo durante días y/o semanas (García-Repetto y col., 2003).

1. 1. 3. 2. BIOTRANSFORMACIÓN

En general, las reacciones de biotransformación de los xenobióticos se dividen en dos fases: reacciones de Fase I y reacciones de Fase II. En las reacciones de Fase I se introduce un grupo reactivo polar dentro de la molécula a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, haciendo que ésta se vuelva más hidrosoluble. En las reacciones de Fase II, los metabolitos polares son conjugados con sustratos endógenos como ácido glucurónico, glutatión, sulfatos, acetatos y aminoácidos formando productos hidrosolubles fácilmente excretables en la orina.

Los OF son compuestos lipofílicos que atraviesan fácilmente la membrana plasmática y son absorbidos. Una vez dentro del organismo son excretados con dificultad si no son transformados previamente en metabolitos más polares (Tang y col., 2006). Por lo tanto, el metabolismo constituye uno de los factores más importantes que determina la persistencia en el cuerpo y la subsiguiente toxicidad para el organismo.

Las reacciones de biotransformación de los compuestos organofosforados pueden dividirse en reacciones de activación y reacciones de detoxificación (Jokanovic, 2001).

A) Reacciones de activación

La biotransformación de organofosforados inactivos hasta compuestos activos se produce principalmente a través de las siguientes reacciones:

1. **desulfuración oxidativa del grupo tiofosfato, que forma compuestos fosfato;**
2. **oxidación del grupo sulfuro, que forma sulfóxidos y sulfonas;**
3. **oxidación de grupos amida que forma N-óxidos o compuestos N-desalquilados;**
4. **hidroxilación de grupos alquilo que forma ésteres fosfato o cetonas; y**
5. **diversas reacciones no oxidativas.**

La **desulfuración oxidativa** es sufrida por OF que tienen un enlace $P=S$. Esta reacción de oxidación conduce a la formación de metabolitos que contienen un enlace $P=O$, llamados oxones, de mayor toxicidad. En efecto, los OF que tienen una estructura de fosforotioato (paratión), de fosforodiotioato (azinfosmetil y dimetoato) o fosfonodiotioato (fonofos) poseen una baja actividad anticolinesterásica debido a la baja electronegatividad del átomo de azufre unido al fósforo. La polarización del enlace $P=O$ da lugar a una mayor electropositividad del átomo de fósforo, lo que facilita el ataque sobre él de agentes nucleofílicos como, por ejemplo, el hidroxilo de la molécula de serina de la AChE. Un ejemplo clásico de activación por desulfuración oxidativa es la conversión del paratión, un anticolinesterásico débil, en paraoxón, un potente anticolinesterásico (Fukuto, 1990).

En esta reacción de metabolización intervienen las monooxigenasas microsómicas de función mixta (MO), en particular el sistema citocromo P-450 y las flavina monooxigenasas (FMO), además de NADPH y oxígeno molecular. La sensibilidad de un animal expuesto a un organofosforado de tipo fosforotioato se debe en gran medida a la velocidad de formación del metabolito oxidado (oxón) que es el responsable de la inhibición de la enzima AChE en los lugares críticos del sistema nervioso, y de la relación existente entre los procesos de activación y detoxificación en el organismo.

La oxidación de grupos tioester se produce *in vivo* en insectos, mamíferos y plantas, obteniéndose la formación de sulfóxidos y sulfonas. Así se produce, por ejemplo, la activación metabólica del disulfotón, el forato y el fentión y la detoxificación del demetón-S-metil.

Otro tipo de reacción de activación es la debida a la **oxidación de un grupo amida**. Ésta es la responsable de que el Schradan u OMPA (octametilpirofosforamida) y el dicrotofos pasen a ser potentes agentes anticolinesterásicos.

Asimismo, dentro del grupo de reacciones de activación metabólica se encuentra la **hidroxilación de un grupo alquilo**. Los sustituyentes que se encuentran en algunos anillos de OF pueden sufrir una hidroxilación de los sustituyentes alquílicos, transformándose en metabolitos como los ésteres o cetonas fosfato, que a su vez sufren otras reacciones metabólicas. Por ejemplo, la oxidación metabólica del triortocresilfosfato (TOCP), el diazinón y el fenitrotión se produce mediante este tipo de reacción.

Finalmente, existen además otras **reacciones no oxidativas** que pueden generar OF más tóxicos que los de partida. Un ejemplo de esto lo encontramos en la rápida transformación del triclorfón y naled en su metabolito activo diclorvos (Jokanovic, 2001).

B) Reacciones de detoxificación

La detoxificación metabólica de los compuestos organofosforados se debe principalmente a la rotura de los enlaces en el átomo de fósforo, lo que provoca que la molécula esté cargada negativamente. Esta carga negativa en el fósforo impide que el

OF sea activo como agente anticolinesterásico. Los metabolitos formados son hidrosolubles y pueden ser rápidamente eliminados por vía urinaria.

Existen dos tipos de enlaces en la molécula del organofosforado que pueden sufrir una ruptura: enlaces anhídridos ($P=O$, $P=S$ o $P-F$) y enlaces alquiléster. Además, para algunos OF puede ser muy importante la biotransformación de grupos funcionales que no están unidos directamente al átomo de fósforo como los grupos carboxiléster, carboxilamida y nitro.

El **enlace anhídrido** puede sufrir una **desarilación oxidativa**, una **hidrólisis enzimática** y una **reacción catalizada por la glutatión S-ariltransferasa**.

La **hidrólisis enzimática** se realiza mediante esterasas denominadas hidrolasas de triéster fosfórico (A-esterasas, fosfotriesterasas). Una reacción típica es la hidrólisis del paraoxón, que es catalizada por la paraoxonasa y en la que se forman dos metabolitos, el ácido dietilfosfórico y el p-nitrofenol, que son inactivos.

Un ejemplo de **reacción glutatión S-ariltransferasa** es la destrucción del diazinón, en la que los productos son metabolitos no tóxicos como el ácido dietilfosforotioico y el conjugado con glutatión S-(2-isopropil-4-metil-6-pirimidinil) glutatión.

Por otra parte, la **ruptura de las cadenas alquiléster** puede producirse por **O-desalquilación oxidativa** y una **reacción catalizada por la glutatión S-alquiltransferasa**. La **O-desalquilación oxidativa** es una de las reacciones más importantes de los OF de tipo triéster de ácido fosfórico, en la que el grupo $P-O$ -alquilo se rompe entre el oxígeno y el grupo alquilo, formándose el correspondiente diéster. Además de las A-esterasas, otros sistemas enzimáticos como las glutatión S-transferasas y las monooxigenasas microsomales pueden tener un importante papel en esta reacción. Por lo que respecta a **las reacciones catalizadas por la glutatión S-alquiltransferasa**, se ha comprobado que la tasa de O-desmetilación de insecticidas organofosforados como el metilparatión, el fenitrotión y el diclorvos, entre otros, se incrementa en presencia del glutatión que actúa de aceptor de grupos metilo.

Finalmente, dentro de las reacciones de destoxificación se encuentran las **reacciones de biotransformación de grupos funcionales que no están unidos**

directamente al átomo de fósforo, como es el caso de **la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos, la reducción o las reacciones de conjugación**. Algunos OF como el malatión, son ésteres de ácidos carboxílicos. Su baja toxicidad en mamíferos se debe a la alta actividad de las carboxilesterasas en sus tejidos. Por el contrario, en los insectos esta actividad es mucho menor y la hidrólisis del malatión es más lenta. Por este motivo, el malatión es altamente tóxico para los insectos. Otros organofosforados como el paratión poseen un grupo nitro y son reducidos enzimáticamente a grupos amino. Los metabolitos amino formados son inactivos como insecticidas y no son inhibidores de la AChE debido a que el grupo amino libera los electrones mientras que el grupo nitro los atrae fuertemente. Por último, las reacciones de conjugación son aquéllas en las que los xenobióticos y sus metabolitos que contienen ciertos grupos funcionales se unen a substratos endógenos y forman metabolitos que, en general, son menos tóxicos que los compuestos de los que provienen. En las modificaciones metabólicas que sufren estos compuestos, algunos grupos funcionales pueden ser introducidos dentro de la parte de la molécula que no está directamente unida al átomo de fósforo. Estas reacciones son importantes para la eliminación de los metabolitos primarios y también para la velocidad de excreción de esos compuestos. Estas reacciones impiden el desplazamiento de compuestos organofosforados lipofílicos a depósitos lipídicos. Existe poca información relevante en relación con la biotransformación de estos compuestos por conjugación con ácido glucurónico y sulfato y por metilación (Jokanovic, 2001).

1. 1. 4. MECANISMO DE ACCIÓN

Los insecticidas organofosforados, al igual que los carbamatos, ejercen su acción a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa. Esta enzima se halla presente en las células nerviosas, siendo específica para la descomposición del neurotransmisor acetilcolina.

Las neuronas colinérgicas sintetizan la acetilcolina mediante la enzima acetilcolina transferasa partiendo de la colina y del cofactor acetil coenzima A. Este neurotransmisor se encuentra en la unión neuromuscular, en la sinapsis preganglionar de los sistemas simpático y parasimpático del sistema nervioso autónomo, en las terminaciones postganglionares parasimpáticas y en el cerebro. Los potenciales de acción generados por la estimulación del sistema colinérgico causan la liberación mediada por calcio de acetilcolina en la sinapsis. La acetilcolina se une entonces a los

receptores postsinápticos vía proteína G en los receptores muscarínicos y a canales iónicos en los receptores nicotínicos. La unión al receptor altera el flujo de iones calcio, sodio y potasio, lo que produce un cambio en la permeabilidad de la membrana, alterando su potencial. Esto permite la propagación del potencial de acción. La AChE, que hidroliza la acetilcolina a colina y acético, se encuentra en cada sitio donde la acetilcolina es el neurotransmisor activo. Esta enzima termina con los efectos de la unión de la acetilcolina al receptor por hidrólisis rápida del neurotransmisor en el espacio sináptico.

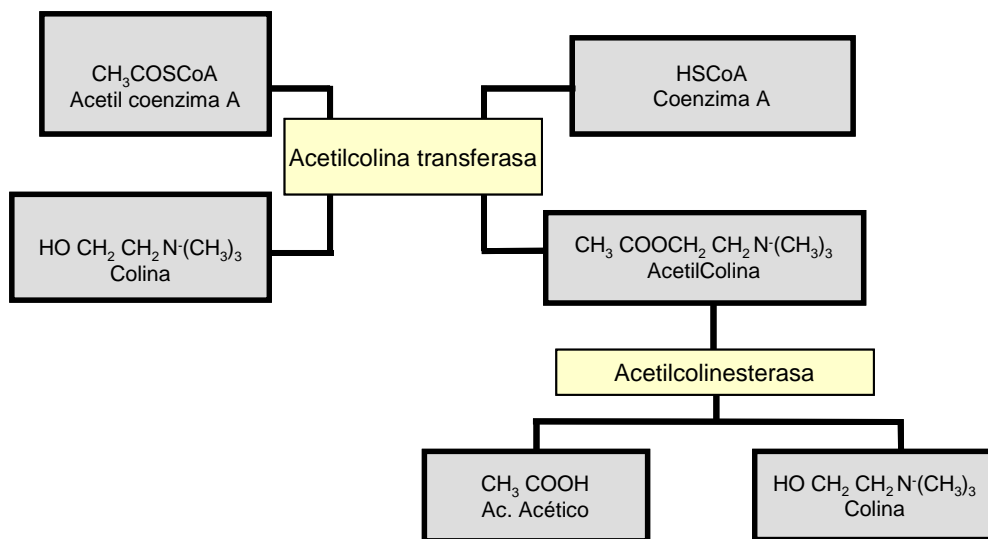


Figura 1.2. Formación y metabolismo del neurotransmisor acetilcolina.

La inhibición de la AChE (y otras B-esterasas) por un éster organofosforado tiene lugar a través de una reacción química en la cual un grupo hidroxilo del aminoácido serina situado en el lugar activo de la enzima es fosforilado de una manera análoga a la acetilación de la enzima por la acetilcolina (Figura 1.3). El grupo hidroxílico de la serina, bloqueado por un resto fosforilo no puede participar en la hidrólisis de la acetilcolina, lo que origina la acumulación de ésta en las sinapsis y finalmente la interrupción de la transmisión del impulso nervioso. En el caso de la acetilcolina, la enzima acetilada solo existe durante una fracción de segundo antes de que mediante la acción de una molécula de agua se regenere la enzima libre y se forme acetato. Por el contrario, la regeneración espontánea de una enzima fosforilada

requiere horas o incluso días, dependiendo de la estructura del organofosforado particular. En el caso de los carbamatos, la regeneración espontánea de una enzima carbamilada generalmente requiere varios minutos dependiendo del compuesto. Es por ello, que normalmente se considera a los carbamatos como inhibidores reversibles de las colinesterasas, mientras que en el caso de los OF, dada la elevada fortaleza del enlace oxígeno-fósforo, y dependiendo de los grupos unidos al átomo de fósforo, su reactivación puede ser tan lenta que, en la práctica, se trate de una inhibición irreversible. Además, en el caso de ciertos organofosforados, la enzima fosforilada puede sufrir un proceso de estabilización posterior conocido como envejecimiento de la enzima, por pérdida de un grupo alquílico del complejo enzimático fosfoforilado. Estas enzimas fosforiladas envejecidas son muy estables y no pueden ser reactivadas ni siquiera con antidotos de tipo oxima, en cuyo caso, la actividad colinesterásica depende casi exclusivamente de la síntesis de nueva enzima.

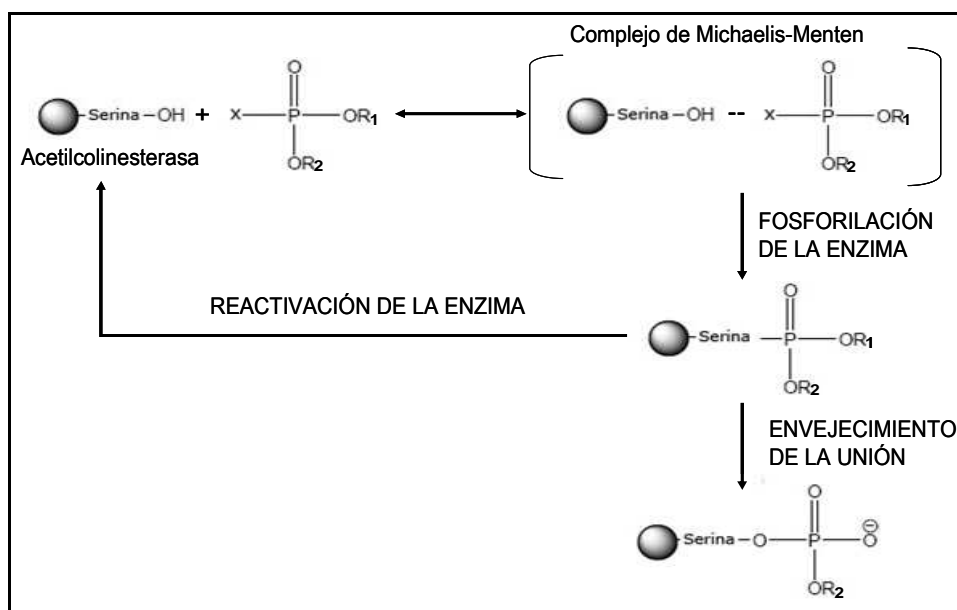


Figura 1.3. Representación de las interacciones bioquímicas entre los OF y la AChE. La primera reacción que se produce entre la enzima y el OF conduce a la formación del complejo de Michaelis. La segunda reacción produce la fosforilación de la enzima. La velocidad de estas reacciones indica la afinidad de la enzima por un determinado OF. A continuación se pueden producir dos reacciones, la primera llevaría a la reactivación espontánea de la AChE, que generalmente es muy lenta, y la segunda produciría una enzima AChE fosforilada estable cargada negativamente (envejecimiento de la AChE fosforilada).

1. 1. 5. TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

1. 1. 5. 1. TOXICIDAD AGUDA

La exposición accidental o intencionada a los OF puede producirse por diferentes vías. Dependiendo de la vía por la que el compuesto penetre en el organismo, los efectos producidos en él y los síntomas que el individuo manifieste pueden variar. Los síntomas habituales que se producen en este tipo de intoxicaciones se deben a la acumulación de la acetilcolina en las terminaciones nerviosas, aunque no todos los síntomas presentes después de una exposición aguda se pueden atribuir a su acción anticolinesterásica (Gupta y col., 2004; Jett y col., 2006). En general, los efectos nocivos tras una exposición de este tipo se pueden manifestar como una crisis aguda colinérgica, un síndrome intermedio o una neuropatía retardada (Lotti, 2001).

1. 1. 5. 1. 1. Crisis aguda colinérgica

Tras la exposición a OF, los primeros efectos en aparecer son los colinérgicos. Estos efectos son el resultado de la inhibición de la enzima AChE y la acumulación de la acetilcolina en los receptores muscarínicos y nicotínicos.

Los efectos sistémicos pueden aparecer desde los pocos minutos hasta transcurridas doce horas tras la exposición, dependiendo de la vía de exposición seguida por el compuesto. Por ejemplo, cuando se inhalan, los síntomas aparecen de forma más rápida; es el caso del sarín o el tabún, en los que los síntomas aparecen a los pocos segundos (García-Repetto y col., 2003). En general, tras la inhalación del compuesto, los primeros efectos observados son respiratorios; éstos pueden ir acompañados de sangrado o moqueo de la nariz, tos, dificultad al respirar, molestias en el pecho o exceso de fluido en los tubos bronquiales. En cambio, los síntomas varían cuando el organofosforado entra en contacto con la piel; en este caso, se suele apreciar sudoración y contracciones musculares involuntarias localizadas. Si el contacto se produce a través de los ojos, entonces se produce dolor, ceguera, lagrimeo, contracción de las pupilas y visión borrosa (Kamrin, 2000). Otro factor a tener en cuenta es la liposolubilidad del compuesto, ésta va a influir en el tiempo de aparición de los síntomas de intoxicación. Así, los compuestos cuya liposolubilidad es alta pueden permanecer en el tejido adiposo y ser liberados lentamente a la sangre.

Por tanto, su toxicidad puede manifestarse hasta varios días después de la exposición (Marrs y Vale, 2006).

Los OF producen un amplio espectro de signos colinérgicos, éstos van a depender del propio compuesto, del organismo expuesto y de la ruta de exposición. En general, los síntomas y signos más frecuentes que se aprecian en estas intoxicaciones son: exceso de lagrimeo, miosis, descenso de la agudeza visual, hipersalivación, hipotermia, convulsiones, incremento de la excitabilidad, falta de coordinación, debilidad muscular, contracciones involuntarias de los músculos, incontinencia urinaria, defecaciones involuntarias, taquicardia, inconsciencia, dificultades respiratorias, exceso de secreciones por vía respiratoria, parálisis de los músculos respiratorios y depresión del centro de control del sistema respiratorio, lo que se considera la principal causa de muerte debido a exposiciones letales (Lotti, 2001).

1. 1. 5. 1. 2. Neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN)

Fue en el siglo pasado cuando Smith y colaboradores (1930) relacionaron la ingesta accidental de tri-o-cresilfosfato (TOCP) con la neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN, *organophosphate induced delayed neuropathy*). Este síndrome se caracteriza por hormigueo de manos y pies, pérdida sensorial y una progresiva debilidad y flacidez de los músculos esqueléticos distales de las extremidades superiores e inferiores, así como ataxia (Lotti y Moretto, 2005; Costa, 2006). Los síntomas comienzan de 1 a 3 semanas después de una sola exposición cuando han remitido tanto los signos colinérgicos como del síndrome intermedio.

El desarrollo de la OPIDN está asociado a la inhibición de la carboxilesterasa neuronal conocida como la esterasa diana de neuropatía (NTE), que debe inhibirse al menos un 75% para que se desarrolle la polineuropatía (Ecobichon, 2005).

En experimentos realizados con animales se ha observado que algunos OF pueden provocar la neuropatía retardada y otras axonopatías químicas sin inhibir a la NTE, fenómeno denominado promoción (Moretto y Lotti, 2006).

1. 1. 5. 1. 3. Síndrome intermedio

El síndrome intermedio, descrito por Senanayake y Karalliedde (1987), es considerado como una tercera clase de efecto neurotóxico de los OF. Se trata de un trastorno paralítico que aparece entre las 24 y 96 horas después de la crisis colinérgica aguda (De Bleecker, 2006) y antes de la neuropatía retardada. Se manifiesta mediante una debilidad muscular, afectando principalmente a los músculos inervados por los pares craneales (flexores del cuello, músculos respiratorios) y a los músculos de las extremidades. Además es frecuente la parálisis de los pares craneales, existiendo un riesgo claro de muerte por depresión respiratoria (Ecobichon, 2005). El mecanismo de acción no se conoce en profundidad, aunque se tiende a pensar que la debilidad muscular puede ser el resultado de una insensibilización de los receptores colinérgicos tras una larga estimulación colinérgica (Costa, 2006). Entre los compuestos químicos involucrados encontramos al malatión (Sudakin y col., 2000), paratión (Can y col., 2001), clorpirifos (Mattingly y col., 2003), fenitión, dimetoato, monocrotofos y metamidofos (Ecobichon, 2005), etc.

1. 1. 5. 2. TOXICIDAD CRÓNICA

La exposición reiterada a bajas dosis de organofosforados provoca una inhibición enzimática que se manifiesta cuando esta inhibición es cada día superior al 1% de la actividad acetilcolinesterasa normal, ya que la síntesis de la AChE es de un 1% al día del total de enzima. Por este motivo, las personas expuestas crónicamente presentan una cierta tolerancia y manifiestan signos de intoxicación aguda cuando la inhibición del enzima es de un 60-70% (García-Repetto y col., 2003). Uno de los grupos de mayor riesgo son los trabajadores que habitualmente manipulan este tipo de compuestos, ya que están expuestos a los OF de forma repetida y prolongada. De igual forma, las personas que utilizan este tipo de pesticidas en el ámbito doméstico y, en especial, los niños que entran en contacto con este tipo de sustancias, pueden presentar una toxicidad crónica.

1. 1. 5. 2. 1. Efectos sobre la reproducción

Algunos estudios realizados con OF han demostrado que éstos pueden causar efectos nocivos sobre el sistema reproductor (Farag y col., 2000). El malatión, que es uno de los pesticidas organofosforados más utilizados, administrado a altas

dosis, reduce el número de embarazos, disminuye la talla de los sobrevivientes y los fetos presentan niveles bajos de actividad colinesterasa (Kamrin, 2000). Otros compuestos como el metilparatión también inducen anormalidades reproductivas. En ratas tratadas con 30 mg/kg/día durante 1 mes se observaron alteraciones en el peso, funciones e histología testicular (Joshi y col., 2003), afectando también a la estructura y a las funciones de los órganos accesorios de reproducción en las ratas macho (Narayana y col., 2006). Asimismo, existen estudios realizados en el hombre y en otros animales en los que se ha demostrado la alteración de las funciones del sistema reproductor masculino, en concreto en la calidad del semen y en el balance hormonal (Padungtod y col., 2000; Piña-Guzmán y col., 2006; Sikka y Gurbuz, 2006). Estos efectos no se presentan, sin embargo, con todos los compuestos. Por ejemplo, tanto el diclorvos (5mg/kg/día) como el azinfosmetil (0,25 mg/kg/día) no producen efectos reproductivos (Kamrin, 2000).

1. 1. 5. 2. 2. Efectos teratogénicos

Los pesticidas OF pueden causar efectos teratogénicos, aunque va a depender del organofosforado involucrado (Pelkonen y col., 2006). En general, en el caso de animales expuestos a organofosforados durante el periodo de gestación, los recién nacidos muestran un bajo peso y alteraciones en el desarrollo neuronal. Algunos, como el metilparatión, pueden atravesar la placenta (Levario-Carrillo y col., 2004) afectando al crecimiento, cerebro y supervivencia del feto en ratas y provocando la presencia de anormalidades en su desarrollo (Pelkonen y col., 2006). No obstante, otras investigaciones realizadas con ratas no muestran relación entre los OF y estos efectos (Kamrin, 2000), como en el caso de ratas hembra tratadas durante la gestación (6-15 días) con una dosis no tóxica para las madres de 1 mg/kg de metamidofos. En este caso, ni las madres ni los neonatos muestran signos de toxicidad, además de no observarse efectos letales sobre los embriones ni malformaciones congénitas, aunque podrían verse afectados los procesos de maduración del feto-embrión (De Castro y col., 2000). Por lo que respecta al hombre, los datos relacionados con la exposición de las madres a organofosforados y sus consecuencias sobre el feto son controvertidos. Algunos estudios muestran que los niños nacidos de madres expuestas a mevinfos o a oxidementometil, presentan, entre otros problemas, daños cardíacos, microftalmia, atrofia cerebral y cerebelosa (Pelkonen y col., 2006). De igual manera, compuestos como el clorpirifos y el fentión pueden inducir este tipo de efectos (Bagchi y col., 2006). Sin embargo, en estudios

recientes realizados en mujeres expuestas a OF durante el embarazo, no se ha podido establecer una relación clara entre la exposición a estos pesticidas y deficiencias en el desarrollo neuronal de los fetos (Young y col., 2005).

1. 1. 5. 2. 3. Efectos mutagénicos

La mayoría de los OF no son mutagénicos, aunque hay varias excepciones como el diazinón y el malatión, entre otros (Kamrin, 2000). En el caso del malatión e isofenfos, sus efectos mutagénicos han sido detectados en cultivos celulares humanos como los linfocitos (Gallo y Lawry, 1991; Williams y col., 2004), estando relacionada posiblemente su actividad mutagénica con la existencia de un centro eletrofílico en el propio malatión o en sus metabolitos, el cual puede unirse al centro nucleofílico de numerosas biomoléculas (Possamai y col., 2007). El diazinón produce la inhibición inmediata y directa de la síntesis de ADN, afectando por tanto a la replicación de las células neuronales. También el clorpirifos y el fentión producen daños en el ADN nuclear y alteraciones en la expresión de los genes (Bagchi y col., 2006). Además, se ha observado que el metilparatión puede ocasionar daños en el ADN de los espermatoцитos maduros (Piña-Guzman y col., 2006).

1. 1. 5. 2. 4. Efectos carcinogénicos

Los estudios sobre esta materia realizados con organofosforados y carbamatos han sido poco concluyentes. La mayoría de las evidencias parecen apuntar a que estos compuestos no causan efectos carcinogénicos en los seres humanos (Kamrin, 2000), aunque sí se han podido observar alteraciones de la función del ADN linfocitario y el desarrollo de leucemia mieloide, en ensayos crónicos realizados con isofenfos (Boros y Williams, 1998; Ray y Ghosh, 2006). Asimismo, experiencias realizadas con ratas Sprague-Dawley a las que se les inyectaron paratión y malatión dos veces al día durante cinco días, han mostrado una mayor proliferación de células de las yemas terminales, seguido de un aumento de carcinomas mamarios después de 28 meses. Estos resultados muestran que tanto el paratión como el malatión inducen la formación de tumores mediante cambios en el epitelio de las glándulas mamarias, estos cambios parecen estar a su vez relacionados con el incremento de la estimulación colinérgica (Cabello y col., 2001).

1. 1. 5. 2. 5. Toxicidad orgánica

Los organofosforados son inhibidores colinesterásicos, sin embargo algunos de estos compuestos como el clorpirifos pueden producir daños que no han podido ser relacionados con la inhibición de las enzimas ChE. Por otro lado, la acción tóxica de algunos OF como el dimetoato altera el estado oxidativo en el hígado y en el cerebro de las ratas tratadas (Sharma y col., 2005).

1. 1. 5. 2. 6. Desorden crónico neuropsiquiátrico inducido por organofosforados (COPIND)

Algunos investigadores han descrito un nuevo síndrome relacionado con los OF y que se ha denominado trastorno neuropsiquiátrico crónico inducido por organofosforados (COPIND, *Chronic Organophosphate Induced Neuropsychiatric Disorder*) (Jamal y col., 2002). Este cuadro está constituido por alteraciones del comportamiento, cognitivas y neuromusculares. Estos efectos no están mediados por una hiperactividad colinérgica, sino que obedecen a causas no del todo conocidas. Se han descrito dos variedades: COPIND tipo I, que sería secuela persistente de intoxicaciones agudas, y COPIND tipo II, en el que no hay antecedentes de intoxicación aguda, sino que la alteración aparece en el contexto de una intoxicación crónica a bajas dosis. Los principales síntomas de esta enfermedad son dolores musculares, apatía, cambios de humor, pensamientos suicidas, falta de memoria y de atención, dificultades de lenguaje y en la escritura, intolerancia al alcohol, incremento de la agudeza olfativa, alta sensibilidad a los OF y discapacidad para mantener la actividad muscular (Ahmed y Davies, 1997). Estos síntomas están además presentes en los soldados afectados por el denominado síndrome de la guerra del Golfo, por lo que pudiera existir una relación entre ambas patologías (Gronseth, 2005).

1. 1. 5. 3. TRATAMIENTO

En general, el tratamiento por intoxicación con OF suele realizarse en personas que intencionada o accidentalmente son expuestas a estos compuestos en altas dosis. Un grupo de especial riesgo al que hay que prestar mayor atención es el de los trabajadores agrícolas, fundamentalmente por dos razones: están en contacto directo con estos compuestos debido a su trabajo y suelen vivir en lugares próximos a los campos de cultivo en los que desarrollan su labor. Asimismo, la utilización de estos

compuestos como armas de guerra en los conflictos armados y en ataques terroristas ha hecho que sea necesaria la búsqueda de tratamiento médico efectivo. El procedimiento habitualmente utilizado ante cualquier intoxicación por OF es el siguiente:

a) Descontaminación: los insecticidas organofosforados suelen formularse como polvos, granulados, aerosoles o líquidos. Las formulaciones suelen tener un componente no polar que les permite penetrar con facilidad en los organismos a través de la piel. Estos compuestos persisten en la piel y en la ropa, por lo que la primera medida ha de ser la de retirar la ropa, seguido de un baño con alcohol etílico y, posteriormente a éste, aplicar un jabón graso alcalino y copiosas cantidades de agua. Si el producto ha sido ingerido y no ha transcurrido más de una hora es conveniente la aspiración del contenido gástrico mediante una sonda nasogástrica. También es útil la inducción del vómito ya que evita la administración de carbón activo o catarsis.

b) Tratamiento específico o antidótico: este tipo de tratamiento requiere el uso de sulfato de atropina y oximas. El sulfato de atropina actúa bloqueando los receptores muscarínicos frente a la acetilcolina, por lo que es útil frente a los síntomas muscarínicos. Sin embargo, no reactiva a la enzima colinesterasa ni acelera la eliminación de los OF.

Las oximas son útiles para combatir los síntomas nicotínicos en la intoxicación aguda por OF. Estos compuestos son nucleofílicos y actúan, a diferencia de la atropina, regenerando la AChE al eliminar el grupo fosfórico del sitio activo del enzima. Además, actúan como secuestradores de las moléculas de organofosforado que todavía están libres. Sin embargo, no son eficaces si se ha producido el envejecimiento de la enzima. Entre ellas podemos nombrar la pralidoxima (2-PAM), la obidoxima y la trimidoxima (García-Repetto y col., 2003).

c) Tratamiento sintomático: se pueden administrar compuestos con actividad anticonvulsionante como el diazepam y el fenobarbital. La mayoría de los pacientes presentan dificultades respiratorias (secreciones bronquiales y broncoespasmo) por lo que puede ser conveniente procurarles respiración asistida. También es recomendable la administración de sueros alcalinos que favorezcan la hidrólisis de los

plaguicidas y disminuyan la eliminación de atropina, además de controlar el equilibrio electrolítico.

1. 1. 6. EFECTOS ECOLÓGICOS

1. 1. 6. 1. EFECTOS SOBRE LAS AVES

Los compuestos organofosforados están presentes en la mayoría de las intoxicaciones de aves, a pesar de su baja persistencia. El uso indiscriminado de estos compuestos así como la intensificación de los cultivos agrícolas ha producido la disminución de la biodiversidad, afectando también a la población avícola. Las aves pueden intoxicarse bien por la aplicación directa del pesticida mediante spray o bien mediante el consumo de alimentos contaminados como agua, semillas, invertebrados o presas con altos contenidos de pesticidas (Hill, 2003). Si la depredación ocurre justo después de la aplicación del insecticida, los niveles de éste en los tejidos de la presa pueden ser lo suficientemente altos como para causar el envenenamiento, porque no ha habido tiempo suficiente para que se produjera una destoxificación efectiva. Además, existen insectos que tienen una cierta resistencia a los OF. Las formas de colinesterasas con las que cuentan son insensibles a la acción de los pesticidas y toleran niveles altos de estos compuestos en sus tejidos, lo que supone un riesgo importante para los animales insectívoros (Walker, 2001).

Si se compara a las aves con los mamíferos, las primeras son más sensibles a la exposición de compuestos organofosforados y carbamatos, ya que las esterasas responsables de la hidrólisis de estos insecticidas (A-esterasas) tienen una actividad más baja en esta clase (Brealey y col., 1980). Por consiguiente, la mayoría de estos compuestos (como el diclorvos o el paratión) son altamente tóxicos para las aves (Kamrin, 2000). Además, los pesticidas pueden dañar el sistema inmunológico de las aves, haciéndolas más propensas a infecciones y enfermedades (Garg y col., 2004).

En ocasiones estos compuestos se usan de manera intencionada contra algún tipo de ave como ocurre en África con *Quelea* spp. Esta ave, que afecta de manera especial a los cultivos africanos, ha sido controlada mediante la aplicación de pesticidas como el paratión en aquellas áreas donde dicha ave habitualmente se posaba (Walker, 2001).

1. 1. 6. 2. EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS

Los insecticidas organofosforados no deberían llegar al agua, pero su uso intensivo, prácticas agrícolas como la inundación y la irrigación, las condiciones climáticas de la zona (temperatura, lluvias, etc.) y la forma en que los compuestos son aplicados (spray, granular, etc.) pueden provocar su presencia en el medio acuático. Además, a pesar de que estos pesticidas son usados para el control de vectores y plagas sobre la superficie terrestre, también podemos encontrar alguna aplicación en el medio acuático (Walker, 2001). Por ejemplo, compuestos como el azametifos o el metilparatión se utilizan en instalaciones de acuicultura para el tratamiento de infecciones causadas por ectoparásitos (Roth y col., 1993). Por todo ello, es cada vez más frecuente la aparición de estudios en los que se pone de manifiesto la presencia de estos compuestos en este medio (Loewy y col., 2003; Hall y Killen, 2005) y sus efectos sobre los organismos que en él habitan (Fulton y Key, 2001; Burridge y col., 2005). La respuesta de los organismos acuáticos a los OF va a depender del rango de tolerancia del organismo, del compuesto, del tiempo de exposición, de la calidad del agua y de la especie.

El peligro de estos compuestos para los organismos acuáticos no es despreciable ya que al actuar sobre el sistema nervioso, inhiben el centro respiratorio del cerebro y las uniones neuromusculares del aparato respiratorio (Coppage y Braidech, 1976). Las alteraciones producidas pueden afectar a la locomoción y al equilibrio de los organismos expuestos (Saglio y col., 1996; Kavitha y Rao, 2007). Así como, hiperactividad, exceso de reacción a estímulos, natación en espiral, movimientos operculares rápidos y un incremento de la amplitud de respiración, llegando a producir inactividad y muerte, si la intoxicación es severa (Carr y Chambers, 2001). Por otro lado, también pueden producir la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que puede causar un estrés oxidativo al organismo (Kavitha y Rao, 2007; Oruç y Usta, 2007).

Por lo general, los animales acuáticos, sobre todo los invertebrados, son más sensibles que los terrestres, y son numerosos los estudios en los que se constata la toxicidad de estos plaguicidas por exposición a corto y largo plazo (Serrano y col., 1997; Varò y col., 2002; Duquesne, 2006; Canty y col., 2007; Gagnaire y col., 2008).

Muchos de los datos existentes sobre este tema se refieren a organismos dulceacuícolas (Agrahari y col., 2007; Corsi y col., 2007), pero los estudios realizados sobre especies marinas (Monteiro y col., 2005; Varò y col., 2007) son menos abundantes. La falta de información en este campo es preocupante, ya que los organismos marinos pueden estar expuestos a pesticidas organofosforados tras su uso en zonas agrícolas desde donde son transportados hacia las aguas costeras.

1. 1. 6. 3. EFECTOS SOBRE OTROS ORGANISMOS

Las tierras dedicadas a usos agrícolas constituyen el 50% de las tierras útiles del mundo, de acuerdo con los datos de la FAO. Según esta misma organización el uso de pesticidas se ha incrementado en un 854% desde 1961 hasta 1999. Esto pone de manifiesto el problema que supone la conservación de la biodiversidad en las zonas donde los pesticidas se usan habitualmente. El uso de pesticidas puede ocasionar problemas en el medio donde se usan, así como en las especies no diana, que habitan en esas áreas. Entre los organismos más sensibles a estos compuestos se encuentra la lombriz de tierra que desempeña un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y en el reciclado de los nutrientes presentes en el suelo. Las lombrices de tierra son animales estrechamente relacionados con el medio en el que viven; tienen unos receptores sensitivos sobre su cuerpo que les hace ser sensibles a los compuestos químicos que hay en el suelo y además ingieren tanto partículas como microorganismos presentes en él. Aunque es difícil establecer una relación directa entre las variaciones de densidad de estos organismos y la aplicación de pesticidas en las áreas próximas, se tienen ciertas evidencias que relacionan el uso de pesticidas con la baja densidad de lombrices encontrada (Reinecke y Reinecke, 2007).

Otros organismos afectados de manera especial por el uso de estos compuestos en los campos de cultivo son los polinizadores, que desempeñan una función esencial para la agricultura y son en ocasiones perjudicados por las acciones del hombre. Un ejemplo de lo anteriormente expuesto tuvo lugar en Canadá, donde el pesticida fenitrotión fue aplicado para combatir la oruga *Choristoneura fumiferana*, teniendo unas consecuencias nefastas para los polinizadores de la zona, tanto para los encargados de polinizar los campos comerciales de arándanos, como para aquéllos que contribuían a la reproducción de la flora nativa (Kevan, 1999). Otros

polinizadores más conocidos que son afectados por los OF son las abejas (Devillers, 2002; Hill, 2003).

1. 1. 7. DESTINO MEDIOAMBIENTAL

En general, estos compuestos presentan una baja persistencia y por tanto sus efectos tóxicos deberían de estar localizados en una determinada zona y durante un tiempo también limitado (Walker, 2001). En todo caso, es necesario conocer los procesos que sufren una vez que llegan al medio y los factores que los condicionan.

1. 1. 7. 1. SUELOS

La mayoría de estos pesticidas son utilizados en el control de plagas tanto en los cultivos agrícolas como de viviendas. Los OF que alcanzan el suelo lo hacen, normalmente cuando el insecticida se aplica sobre el cultivo en forma de spray. Una vez en el suelo entran a formar parte de él, sufriendo procesos de disipación dentro de este ecosistema de reciclaje. La degradación a la que son sometidos hace que su persistencia en el suelo no sea muy alta. La vida media de degradación de la mayoría de estos compuestos se mide en términos de varias semanas, interviniendo procesos como la degradación microbiana, la hidrólisis, la volatilización del compuesto y la fotodegradación (Kamrin, 2000).

Otro aspecto que hay que considerar en la degradación de estos plaguicidas es el tipo de formulación utilizada en su aplicación. Puede tratarse de compuestos puros (uso en laboratorios), emulsiones concentradas o emulsiones granulares. Existen estudios en los que se observa que, compuestos como el clorpirifos, presentan diferente tasa de degradación dependiendo de la formulación, emulsión concentrada o granular que se haya aplicado (Racke, 1992).

En general, los compuestos organofosforados son menos persistentes en los suelos que el resto de los pesticidas, aunque tanto su comportamiento como su destino en el suelo, están condicionados por factores como la temperatura, el pH, la composición mineral de los suelos, la materia orgánica, los microorganismos y la humedad.

El tiempo de vida media y la distribución de estos compuestos están estrechamente relacionados con las radiaciones luminosas y el pH (García-Repetto y col., 1994). Por un lado, las radiaciones solares y/o las altas temperaturas pueden hacer que los tiones se oxiden a oxones en el medio (es el caso del malatión que se transforma en iso-malatión, de mayor toxicidad), y, por otro, la velocidad de hidrólisis depende del pH, de manera que cuanto más alto sea éste, más rápida será la hidrólisis. Por consiguiente, la mayoría de estos compuestos no son muy persistentes en suelos alcalinos o en agua (Walker, 2001).

Finalmente, también influye el tipo de suelo; por ejemplo, en suelos ricos en materia orgánica y con concentraciones altas de metales inorgánicos, estos compuestos presentan menos movilidad. No obstante, hay excepciones; por ejemplo, el clorpirifos y el diazinón incrementan su degradación si están en contacto con cobre inorgánico (Kamrin, 2000).

1. 1. 7. 2. AGUAS

Los insecticidas organofosforados están presentes en el medio acuático de numerosos lugares del mundo. Ríos, estuarios, aguas costeras, aguas subterráneas e incluso agua de lluvia han sido contaminados con estos compuestos debido a su intenso uso (Steen y col., 2001; Loewy y col., 2003; Quaghebeur y col., 2004; Li y col., 2005; Sankararamakrishnan y col., 2005; Moore y col., 2007).

La forma más habitual de penetración de los OF en el medio acuático es mediante las aguas de escorrentía o bien mediante la pulverización en cultivos cercanos a estos sistemas. Por otra parte, es escasa la aplicación directa de este tipo de insecticidas a los sistemas acuáticos con el fin de controlar las plagas acuáticas, los mosquitos o sus larvas, aunque, su uso en acuicultura para combatir ciertos ectoparásitos, es cada vez mayor.

Una vez dentro del sistema acuático, estos compuestos tienden a disiparse rápidamente desde la columna de agua mediante su adsorción sobre los sedimentos, la volatilización, la fotodegradación, hidrólisis y la degradación microbiana.

La degradación de los OF en aguas superficiales depende en gran medida de la temperatura. Por ejemplo, el metilparatión tiene una vida media de 8 días durante el

verano y de 38 días en invierno. Los demás organofosforados presentan una respuesta similar. Otro factor que hay que tener en cuenta es el pH, ya que afecta al rango de degradación. A pH alcalinos se produce una mayor degradación (Kamrin, 2000).

1. 1. 7. 3. VEGETACIÓN

Estos pesticidas son aplicados en los campos de cultivo, en flores ornamentales o árboles frutales para el control de ciertos insectos. Diversos estudios han demostrado que los residuos que aparecen en hojas de los cultivos presentan mayores niveles de insecticidas que los encontrados en los suelos, aunque los procesos de degradación son mucho más rápidos en la superficie de la planta que en el suelo. Por ejemplo, el clorpirifos presenta una mayor concentración en la hoja de la planta de maíz (99 a 171 ppm) pero tiene una vida media de 1,5 días, mientras que en el suelo la concentración encontrada es mucho menor (3 a 6 ppm) pero la vida media del compuesto varía de 7 a 17 días. La rápida degradación de los compuestos en las hojas de las plantas puede deberse a que sean más susceptibles a procesos como la volatilización y la fotodegradación. Además, estos compuestos pueden penetrar dentro de la planta y ser metabolizados o ser arrastrados por el agua de lluvia (Racke, 1992), una vez en el suelo los plaguicidas son absorbidos principalmente a través de las raíces. Teniendo en cuenta la baja permanencia de estos pesticidas, se han considerado tradicionalmente como poco o escasamente bioacumulables; así, los residuos de OF como el azinfosmetil, clorpirifos o diazinón, permanecen en la planta del orden de una a tres semanas (Kamrin, 2000).

Los efectos de los organofosforados en plantas dependen de varios factores como la tasa y la frecuencia de aplicación, la naturaleza de la planta y de las condiciones atmosféricas. Su presencia en las plantas puede presentar ciertos riesgos. En primer lugar, el consumo por parte de seres humanos y animales de plantas que contienen residuos de OF. Por esta razón existe una restrictiva legislación en este tema por parte tanto de la EPA como de la Unión Europea. En segundo lugar, se encuentran los trabajadores de los campos de cultivo que están expuestos a estos compuestos, sobre todo en la época de aplicación (Fenske y col., 2003; Dasgupta y col., 2007). En tercer lugar, debido al tipo de formulación que normalmente se utiliza, el spray, los residuos de los insecticidas pueden caer al agua, afectando a los animales que en él habitan (Ray y Ghosh, 2006).

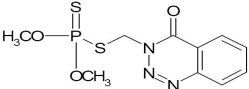
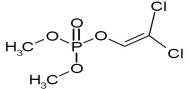
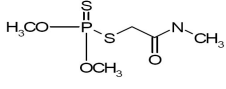
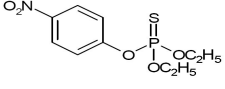
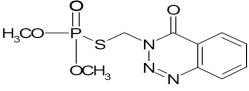
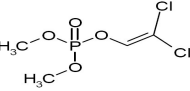
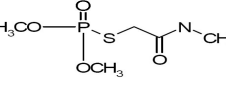
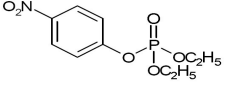
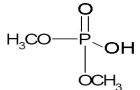
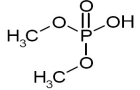
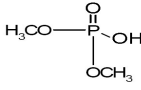
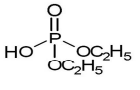
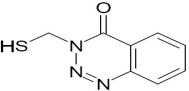
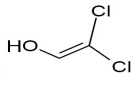
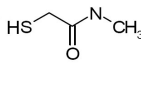
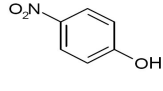
1. 2. ORGANOFOSFORADOS OBJETO DE ESTUDIO

Los plaguicidas organofosforados objeto de este estudio son:

- Inhibidores indirectos de las colinesterasas, que necesitan metabolizarse hasta sus oxones activos
 - Paratión de tipo fosforotioato
 - Azinfosmetil y dimetoato de tipo fosforoditioato
- Inhibidor directo de las colinesterasas
 - Diclorvos, de tipo fosfato

En la Tabla 1.2 se resumen algunas características químicas y toxicológicas de dichos compuestos, aspectos que se desarrollan en los apartados siguientes y que han sido revisados por Kamrin (2000).

Tabla 1.2. Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de los organofosforados objeto de estudio.

Nombre común	Azinfosmetil	Diclorvos	Dimetoato	Paratión
Nombre químico	O,O-dimetil-S-((4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3 (4H)-il) metil) fosforoditioato	2,2-diclorovinil dimetil fosfato	O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato	O,O-dietil O-4-nitrofenil fosforotioato
CAS-RN	86-50-0	62-73-7	60-51-5	56-38-2
Log Kow	2,75	1,43	0,78	3,83
Solubilidad	20,9 mg/L (20°C)	8×10 ³ mg/L (20°C)	>5000 mg/L (20°C)	11 mg/L (20°C)
Estructura química				
Metabolito activo (oxón)	 Azinfosmetil-oxón	 Diclorvos	 Ometoato	 Paraoxón
Grupo fosforilante				
Grupo saliente				
DL ₅₀ oral rata	11 mg/kg	17 mg/kg	500-680 mg/kg	1,8 mg/kg

1. 2. 1. AZINFOSMETIL

1. 2. 1. 1. INTRODUCCIÓN

El azinfosmetil (O,O-dimetil S-[(4-oxon-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il)metil] fosfoditioato) (CASRN: 86-50-0) o Gutión (Tabla 1.2) es un insecticida organofosforado no sistémico del grupo de los ditiofosfatos. Su uso es fundamentalmente agrícola, permitiendo controlar varios tipos de insectos y gusanos, que afectan a árboles frutales, frutos secos, fresas, patatas, maíz, algodón, café, etc.

1. 2. 1. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS

1. 2. 1. 2. 1. Toxicidad aguda

El azinfosmetil es uno de los insecticidas OF más tóxicos, siendo su principal mecanismo de acción la inhibición de las enzimas ChE. Este compuesto es altamente tóxico por inhalación, absorción cutánea, ingestión y por contacto con los ojos. La ingestión del azinfosmetil en cantidades superiores a 1,5 mg/día en humanos, puede causar serios problemas como reducción de la visión, salivación, exceso de sudoración, dolores estomacales, vómitos, diarreas, inconsciencia e incluso la muerte. Por otro lado, la inhalación de polvo o de una preparación de aerosoles de este organofosforado puede causar opresión en el pecho, visión borrosa y lagrimeo. Los síntomas desaparecen una semana después de la exposición, siempre y cuando no persista la exposición o ésta no haya sido fatal. De igual forma, el gutión puede ser absorbido fácilmente por la piel, pudiéndose acumular en el organismo tras la exposición. Los síntomas asociados a este tipo de exposición son: náuseas, vómitos, visión borrosa, y calambres musculares. En cambio, si el compuesto penetra en los ojos, en pocos minutos puede producir visión borrosa, lagrimeo, dolores y otra serie de problemas (Kamrin, 2000).

La DL₅₀ del azinfosmetil presenta una amplia variedad de valores dependiendo de la ruta de exposición y del tipo de animal afectado.

1. 2. 1. 2. 2. Toxicidad crónica

La inhibición de las colinesterasas puede producirse tras la repetida exposición a pequeñas cantidades del compuesto, persistiendo de 2 o 6 semanas. Esta inhibición puede ir acompañada de malestar general, debilidad y falta de apetito. Los trabajadores agrícolas son uno de los colectivos más expuestos a este compuesto al entrar en contacto con él durante la aplicación del mismo, o al manipular las plantas que han sido tratadas (Fenske y col., 2003). Los individuos expuestos sufren problemas respiratorios, desórdenes convulsivos o presentan una mayor sensibilidad a otros inhibidores colinesterásicos (Kamrin, 2000). Los niños son otro de los grupos que puede verse afectado por el pesticida, sobre todo aquéllos que viven en zonas agrícolas (Lu y col., 2004; Rohlman y col., 2005).

Las ratas toleran dosis diarias de 0,25 mg/kg/día de azinfosmetil durante 60 días sin inhibición de colinesterasa, aunque una dosis de 1 mg/kg/día parece tener efectos sobre el crecimiento de los animales, causando una leve inhibición de las ChE presentes en cerebro y en sangre (Kamrin, 2000).

Efectos sobre la reproducción: con objeto de determinar los posibles efectos de este insecticida se han realizado experimentos con diferentes animales como ratas, ratones o peces. En el caso de las ratas no se ha observado ningún efecto de este tipo cuando las dosis utilizadas fueron de 0,25 mg/kg/día.

Los estudios realizados parecen apuntar a que este compuesto no presenta efectos reproductivos o éstos son poco probables en el ser humano, en condiciones normales (Kamrin, 2000).

Efectos teratogénicos: las experiencias realizadas con ratas en su octavo día de gestación expuestas a dosis de 16 mg/kg por vía oral, han mostrado desarrollos anómalos en músculos y en huesos. Sin embargo, no se esperan efectos de este tipo en los seres humanos a las dosis habituales de exposición (Kamrin, 2000).

Efectos mutagénicos: los datos obtenidos parecen sugerir que el azinfosmetil no produce efectos mutagénicos, ya que no se apreciaron dichos efectos en el test de Ames sobre bacterias y en los test realizados con cultivos celulares humanos (Kamrin, 2000).

Efectos carcinogénicos: la relación entre el azinfosmetil y los tumores de páncreas y de células tiroideas en ratas ha sido objeto de estudio; de ellos se desprende la posibilidad de que exista tal relación. Sin embargo, no se ha observado un incremento significativo de los tumores en ratones expuestos a una dosis de 10 mg/kg/día (Kamrin, 2000), por lo que no se ha podido establecer una relación clara.

1. 2. 1. 2. 3. Destino en animales y humanos

Algunos estudios sugieren que el Gutión es rápidamente degradado dentro del organismo a otras formas no nocivas para el mismo, siendo eliminado a través de las heces y la orina dos días después de la administración en mamíferos (Kamrin, 2000).

El azinfosmetil como tal es un pobre inhibidor de las ChE, pero si se metaboliza a azinfosmetil-oxón en el hígado, el efecto es sustancialmente distinto (Jokanovic, 2001). En vertebrados esta reacción ocurre mediante el sistema enzimático monooxigenasa, localizado en los microsomas, mientras que en invertebrados su metabolismo no ha sido completamente esclarecido. Sin embargo, se han caracterizado algunos de los componentes del sistema monooxigenasa del que depende el citocromo P450 en gasterópodos (Solé y Livingstone, 2005).

1. 2. 1. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS

1. 2. 1. 3. 1. Efectos sobre las aves

En general, el azinfosmetil presenta una toxicidad de suave a moderada para las aves. Así, en estudios realizados en poblaciones avícolas de Québec (Canadá), se comprobó que las aves recogidas en las zonas tratadas con este organofosforado mostraban una disminución de la actividad colinesterasa tras la aplicación. Sin embargo, no se apreciaban otros efectos significativos, lo que puede deberse a una reducida exposición al pesticida, ya que las aves pueden alimentarse y anidar fuera de las áreas tratadas (Graham y DesGranges, 1993). Por otro lado, se ha constatado la presencia de este compuesto en las plumas y patas del ave *Molothrus ater* días después del tratamiento (Vyas y col., 2007).

Los síntomas de una intoxicación aguda por azinfosmetil incluyen regurgitación, caída y espasmos de las alas, diarrea y falta de movimiento (Kamrin, 2000).

1. 2. 1. 3. 2. Efectos sobre organismos acuáticos

El azinfosmetil es un compuesto de moderado a altamente tóxico para la mayoría de los organismos acuáticos, presentando la mayoría de las especies valores de CL_{50} menores de 1 mg/L (Kamrin, 2000).

Los síntomas que presentan los invertebrados son variados, existiendo especies en las que se aprecia un desorden en el movimiento, como en el oligoqueto *Lumbriculus variegatus*, mientras que el gasterópodo *Biomphalaria glabrata* no lo presenta (Kristoff y col., 2006). Del mismo modo, los peces expuestos a este compuesto muestran síntomas diversos, como alteraciones en el sistema nervioso central, natación errática, convulsiones incontroladas, movimientos branquiales rápidos, parálisis y finalmente la muerte. Además se han observado hemorragias generalizadas en las áreas ocular y opercular en *Carassius aurata* tras una exposición de 24 horas a la concentración letal media (Ferrari y col., 2004a). Asimismo, las larvas de diferentes especies pueden ser afectadas por este compuesto. Así se ha comprobado que el azinfosmetil afecta a la longitud de las larvas del pez *Oryzias latipes* (Teather y col., 2005). En el caso de larvas endotróficas de dorada, hemos obtenido valores de CL_{50} de 20,03 µg/L y 4,59 µg/L de azinfosmetil, para periodos de exposición de 48 y 72 h, respectivamente (Arufe y col., 2007).

Este organofosforado puede alterar la estructura de la comunidad y de la población de los sistemas acuáticos, tal y como se observó en la población de salmónidos del río Wilmot (Cánada), zona en la que este pesticida es usado habitualmente en el cultivo de la patata. Análogamente, el azinfosmetil ha sido relacionado con varios episodios de mortandad de peces producidos en esta zona de Cánada y en los Estados Unidos (Gormley y col., 2005).

1. 2. 1. 3. 3. Efectos en otros organismos (especies no diana)

Este pesticida es especialmente tóxico para las abejas y otros insectos beneficiosos que podrían verse afectados durante el tratamiento o en días posteriores

(Kamrin, 2000). Otros organismos como las lombrices de tierra pueden ver afectado su crecimiento y tasa de reproducción cuando sufren una exposición intermitente a este compuesto (Reinecke y Reinecke, 2007).

1. 2. 1. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL

1. 2. 1. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas

Factores ambientales como la temperatura, las lluvias, el viento reinante en la zona afectan de manera especial al depósito y movilidad de este compuesto, así como la naturaleza y composición del suelo, su esterilidad o no, etc. Así, la vida media del azinfosmetil en suelos con arcillas y limos es de cinco días, pero va a variar considerablemente dependiendo de la esterilidad o no de los suelos, de este modo la vida media de este compuesto en suelos no estériles va a ser de entre 21-68 días mientras que en suelos estériles va a alcanzar los 355 días. En general, la persistencia de este compuesto en el suelo es baja, en condiciones normales.

Las principales rutas de degradación de este organofosforado son las rutas de biodegradación y de evaporación. Asimismo, esta degradación se ve afectada por la radiación ultravioleta (UV) procedente del sol y por la descomposición hidrolítica. De este modo, la desaparición de este compuesto es más rápida en capas superficiales (0 a 2,5 cm de profundidad) que en capas de mayor profundidad (2,4 a 7,5 cm) (Kamrin, 2000).

La posibilidad de que el azinfosmetil alcance los acuíferos es escasa ya que posee un bajo potencial de filtración. No obstante, su uso intensivo unido a fenómenos como la lluvia y la irrigación puede provocar su aparición en concentraciones apreciables en este tipo de agua (Loewy y col., 2006).

1. 2. 1. 4. 2. Aguas superficiales

Este insecticida es uno de los OF que con mayor frecuencia se encuentra en el agua. En ocasiones se encuentra por encima de los criterios recomendables para la vida acuática (Gruber y Munn, 1998) e incluso para la salud humana (Loewy y col., 2003). Una vez en ella, el azinfosmetil es rápidamente disipado, aunque pueden

permanecer durante más tiempo si se encuentra formando parte de las partículas en suspensión (Schulz, 2001).

El azinfosmetil puede modificar su comportamiento en agua debido a factores como la temperatura, la luz UV o el pH (Loewy, 2000). Así, el azinfosmetil es estable en aguas cuyo pH está por debajo de 10, siendo rápidamente hidrolizado a ácido antranílico, benzamida y otros metabolitos, en aguas cuyo pH es superior a 11 (Kamrin, 2000).

1. 2. 1. 4. 3. Vegetación

Los niveles de residuos del azinfosmetil sobre los cultivos dependen del ritmo y la frecuencia de aplicación, de la naturaleza de la planta y de las condiciones atmosféricas, destacando dentro de esta última la humedad relativa. Ésta ejerce una importante influencia sobre la degradación de este compuesto, lo que parece sugerir un mecanismo de degradación principalmente hidrolítico (Athanasopoulos y col., 2004). En general, la vida media de este compuesto sobre las plantas y los cultivos suele ser de 3 a 5 días dependiendo de las condiciones ambientales (Kamrin, 2000). Sin embargo, análisis realizados en plantaciones australianas de vid han revelado la presencia de este pesticida en la uva, pudiendo detectarse incluso en el vino obtenido de ella (Goodwin y Ahmad, 1998). Su posible presencia como residuo en ciertos alimentos ha motivado el estudio de los mecanismos que sufre este organofosforado una vez que penetra en la planta. Así, ensayos recientes realizados con la bacteria *Salmonella typhimurium* (variedades TA98 y TA100) han mostrado los efectos mutagénicos del azinfosmetil, una vez que el compuesto ha sido activado mediante la planta de tabaco (Gómez-Arroyo y col., 2007). Por otro lado, algunas plantas macrofitas acuáticas están siendo investigadas, ya que pueden desempeñar un importante papel en la reducción de la contaminación producida por pesticidas como el azinfosmetil (Dabrowski y col., 2006).

1. 2. 2. DICLORVOS

1. 2. 2. 1. INTRODUCCIÓN

El diclorvos (2,2-diclorovinil dimetil fosfato) (CASRN: 62-73-7) (Tabla 1.2) es uno de los OF más utilizados en Europa para el control de insectos en programas de salud pública, cultivos, domicilios, almacenes e invernaderos, así como para combatir a ectoparásitos en instalaciones de acuicultura y gusanos parásitos que afectan a los animales domésticos y al propio hombre. Sus principales organismos diana son las arañas, las orugas, las moscas, etc. sobre los que el diclorvos actúa por contacto o por ingestión estomacal.

La potencial toxicidad de este compuesto y de algunos de sus derivados ha sido estudiada tanto en hombres como en animales de laboratorio desde los años cuarenta. Muchas organizaciones han financiado estos estudios, no solo por el riesgo que puede entrañar para los trabajadores y/o los consumidores que manipulan habitualmente este compuesto o para otros organismos no diana, sino por sus usos farmacéuticos. En la actualidad está siendo probado para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer o la esquistosomiasis (MacGregor y col., 2005).

1. 2. 2. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS

1. 2. 2. 2. 1. Toxicidad aguda

El diclorvos es altamente tóxico por inhalación, absorción dérmica e ingestión. La inhalación es la ruta más frecuente de exposición, al ser este compuesto volátil, pero como la mayoría de los pesticidas organofosforados, el diclorvos es fácilmente absorbido a través de la piel (Kamrin, 2000).

El diclorvos, a diferencia de otros OF, produce la aparición rápida de los síntomas, acompañada de una pronta recuperación en la mayoría de los casos, dada la rápida degradación de este compuesto por el metabolismo de los mamíferos (Kamrin, 2000). A pesar de esto, se ha demostrado que la inhalación de este compuesto por ratas puede producir cambios neuropáticos en el nervio frénico y en el diafragma, así como la degeneración de los epitelios traqueales y pneumonitis tóxica

no infecciosa, pudiendo tener algún tipo de efecto sobre los hombres que inhalan este tipo de compuesto (Atis y col., 2002).

Asimismo, los efectos tóxicos del diclorvos pueden incrementarse como consecuencia de la exposición a altas temperaturas, la presencia de luz o por consumo de bebidas alcohólicas (Kamrin, 2000).

Los síntomas de la exposición aguda a este compuesto coinciden con los producidos por la mayoría de los OF, pero además este compuesto ha sido relacionado con la polineuropatía retardada o síndrome OPIDN, cuyos síntomas aparecen una o dos semanas después de la intoxicación (Lee y col., 2006).

1. 2. 2. 2. Toxicidad crónica

La administración crónica del diclorvos produce problemas motores y de memoria en ratas (Sarin y Gill, 1998). Del mismo modo, este compuesto tiene efectos neurotóxicos en estos animales debido a la perturbación neuronal de la homeostasis del calcio (Raheja y Gill, 2002). Análogamente, se ha comprobado que la administración subcrónica de este OF produce peroxidación lipídica, lo que parece indicar que las especies de oxígeno reactivo pueden estar relacionadas con los daños en el endometrio y de apoptosis que ocasiona este compuesto (Oral y col., 2006). Otro estudio realizado sobre estos animales, cuyos individuos inhalan concentraciones de 0,5 mg/L de diclorvos durante de cinco semanas, muestra un decrecimiento significativo de la actividad colinesterásica en el plasma, los glóbulos rojos y el cerebro. Por otro lado, las ratas macho expuestas repetidamente a altas dosis muestran anormalidades en los tejidos del pulmón, corazón, tiroides, hígado y riñones. Otros animales como los perros han mostrado una disminución de la actividad de las enzimas ChE de los glóbulos rojos, además de un incremento del tamaño de las células hepáticas y del peso del hígado, cuando se exponen durante dos años a una dosis diaria de entre 1,6 a 12,5 mg/kg/día en su dieta. Este aumento del hígado fue observado también en los cerdos, cuando se les expone a altas dosis durante largos periodos de tiempo. Además, este compuesto puede producir la acumulación de líquido en los pulmones (edema pulmonar) (Kamrin, 2000).

Efectos sobre la reproducción: no se han encontrado evidencias de que el diclorvos tenga efectos en la reproducción, aunque estudios recientes sugieren la posibilidad de

que este OF puede producir este tipo de efecto en especímenes de *Drosophila melanogaster* a concentraciones de 0,015-15 ppb (Gupta y col., 2007). Sin embargo, en otras experiencias realizadas en ratas (macho y hembra) alimentadas con 5 mg/kg/día antes del apareamiento, durante el embarazo y la lactancia, no se detectaron efectos sobre la reproducción, la supervivencia o el crecimiento de la prole, aunque se observó la inhibición colinesterásica en madres y en la prole (Kamrin, 2000). Por otro lado, se han investigado los posibles efectos negativos de este compuesto sobre el sistema reproductor masculino en ratas (macho) expuestas a distintas dosis de diclorvos. De los resultados obtenidos se desprende que este compuesto no afecta a la histopatología testicular de las ratas y que el riesgo de una disfunción testicular en el hombre es mínimo (Okamura y col., 2005).

Efectos teratogénicos: se han realizado distintos experimentos para intentar demostrar la relación del diclorvos con este tipo de efectos. De este modo, se realizaron experiencias con ratas embarazadas a las que se administraron dosis de 8 mg/kg durante un periodo de 10 días sin que se apreciaran efectos tóxicos ni para la madre ni para el feto (Lazarini y col., 2004). Resultados similares fueron encontrados tanto al exponer a concentraciones aéreas de 6,25 mg/L durante el embarazo a ratas y a conejos, como al administrar este compuesto por vía oral a las ratas (Kamrin, 2000).

Efectos mutagénicos: el diclorvos puede producir estos efectos (Rose y col., 1999), pudiendo unirse a moléculas como el ADN. De hecho, este organofosforado dio positivo en el ensayo de mutagenicidad de Ames y en otros test de cultivos celulares bacterianos (Kamrin, 2000). Estudios realizados en cultivos celulares de ovario de hámster han demostrado que este compuesto a concentraciones de 0,01 μ M daña significativamente el ADN, pudiéndose relacionar el daño causado por el diclorvos con el estrés oxidativo y con las especies reactivas de oxígeno generadas (Patel y col., 2007).

Efectos carcinogénicos: este OF ha sido clasificado como un compuesto posiblemente carcinogénico para el hombre por la IARC (grupo 2B) y la EPA (grupo B2) (IARC, 1991; USEPA, 1996). Sin embargo, otros autores piensan que el diclorvos no puede clasificarse como cancerígeno para el hombre al no tener actividad genotóxica en estudios *in vivo*, y siendo las evidencias en animales limitadas y en el hombre inadecuadas (Van Maele-Fabry y col., 2000).

El Programa Nacional de Toxicología americano estudió los efectos del diclorvos en ratones (B6C3F1) y en ratas (Fischer 344) durante dos años. La administración de diclorvos en ratas se relacionó con un incremento de la incidencia de adenomas pancreáticos en ambos sexos, leucemia en machos y tumores mamarios en hembras. En cuanto a los ratones, la administración de este compuesto se asoció con una proliferación de lesiones en el estómago tanto en hembras como en machos. Por otro lado, Van Maele-Fabry y colaboradores (2000) al evaluar los estudios anteriores concluyeron que existía una relación positiva entre la administración del diclorvos y la incidencia de la leucemia en ratas y las lesiones neoplásticas en el estómago en ratones. Para los demás tipos de tumores, estos autores consideraron que la relación era probable. Sin embargo, otros autores, tras la revisión de once estudios realizados con distintas especies de ratones y ratas a los que se les suministra este compuesto por inhalación o vía alimentaria, concluyeron que no hay suficientes evidencias para afirmar que este OF sea cancerígeno (Ishmael y col., 2006).

1. 2. 2. 3. Destino en animales y humanos

El diclorvos es rápidamente metabolizado y excretado por los mamíferos. En ratas expuestas a 11 mg/L durante 4h, solo se detectó el compuesto en los riñones. Tras una exposición de 50 mg/L la vida media del diclorvos en el riñón de la rata fue de 13,5 min. La razón de la rápida desaparición de este OF se debe a la presencia de enzimas degradadoras tanto en tejidos como en plasma sanguíneo. Cuando el diclorvos es absorbido tras la ingestión, se transporta rápidamente al hígado donde es destoxificado. De este modo, las ratas expuestas a dosis letales medias orales o dérmicas se mueren al cabo de una hora o se recuperan completamente (Kamrin, 2000).

El diclorvos no se acumula en los tejidos, sin embargo ha sido detectado en concentración baja en la leche de las ratas, con lo que podría suponer un riesgo para su prole durante semanas y meses (Dési y Nagymajtényi, 1999).

1. 2. 2. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS

1. 2. 2. 3. 1. Efectos sobre las aves

El diclorvos es altamente tóxico para aves. La DL_{50} oral de las aves en el medio natural es de 12 mg/kg (Kamrin, 2000).

1. 2. 2. 3. 2. Efectos en organismos acuáticos

Este compuesto es un pesticida tóxico para los organismos acuáticos, aunque esta toxicidad va a estar relacionada con el tipo de organismo. Así, los crustáceos son más sensibles al diclorvos que los bivalvos y los artrópodos acuáticos a su vez más que los peces. También se observan diferencias dentro del mismo grupo. Por ejemplo, en el caso de los anfibios, *Bufo melanostictus* es menos sensible al diclorvos que *Microhyla ornata* (Geng y col., 2005).

Por otro lado, este OF es adicionado en las instalaciones de acuicultura para el tratamiento de infecciones por ectoparásitos, pudiendo afectar a otros organismos próximos a las instalaciones. Por ejemplo, el mejillón *Mytilus edulis* que habita cerca de instalaciones de acuicultura en lagos de Escocia muestra una inhibición acumulativa de la actividad acetilcolinesterasa (McHenery y col., 1997).

Los peces *Cyprinus Carpio* y *Silurus glanis* expuestos a altas concentraciones de diclorvos presentan comportamientos anormales, como natación errática y cerca de la superficie, apertura rápida de las branquias y por último, ausencia de movimientos de los peces que permanecen en el fondo del acuario (Ural y Çalta, 2005; Ural y Köprücü, 2006).

1. 2. 2. 3. 3. Efectos sobre otros organismos (especies no diana)

El diclorvos es tóxico para insectos como las abejas (Kamrin, 2000).

1. 2. 2. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL

1. 2. 2. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas

El diclorvos tiene una baja persistencia en suelos, siendo su vida media en suelos arcillosos de siete días, aunque ésta va a depender de otros factores como el pH. Así, la vida media del diclorvos es de 4,5 horas a pH 9,1, mientras que es de 50 horas a pH 1. Por otro lado, debido a la volatilidad de este organofosforado, en los suelos presenta escasa persistencia, que será algo mayor si éstos están húmedos. Una vez que el diclorvos ha llegado al suelo y se ha depositado sobre él, puede sufrir procesos de hidrólisis y biodegradación. A pesar de que este compuesto no tiende a adsorberse sobre los sedimentos, su presencia ha sido detectada en muestras de sedimentos recogidas en el río Wuchuan (China), aunque ésta puede deberse a la aplicación reciente del organofosforado en la zona (Zhang y col., 2002).

Además, este compuesto posee una penetrabilidad de un 18-20%, pudiendo alcanzar en 5 días una profundidad de 30,5 cm (Kamrin, 2000).

1. 2. 2. 4. 2. Aguas superficiales

El diclorvos es arrastrado por las lluvias hasta la superficie terrestre, donde se incorporan al ciclo hidrológico, al ser un compuesto volátil y muy soluble en agua. Así, este OF se ha encontrado en agua de muy diversa procedencia como en agua de lluvia recogida en distintas zonas de Bélgica (Quaghebeur y col., 2004), en aguas de río del norte del Reino Unido (Robson y Neal, 1997) y del río Scheldt en Francia (Steen y col., 2001), en aguas estuarinas del río Jiulong en China (Zulin y col., 2002), así como en el mar de Florida (Bolton-Warberg y col., 2007).

Una vez en el medio acuático el diclorvos sufre procesos de degradación como la hidrólisis o bien tiende a escapar del medio por volatilización. La primera va a depender del pH, siendo más lenta a pH ácido y más rápida a pH básico. Asimismo, la biodegradación puede producirse bajo condiciones ácidas, lo que enlentece la hidrólisis, o donde se encuentre presente una población de microorganismos aclimatados. La volatilización es lenta y se estima que dura unos 57 días en las aguas procedentes de ríos y unos 400 días en estanques (Kamrin, 2000). La salinidad del agua también influye a la hora de establecer la vida media de este compuesto en el

medio acuático; si la salinidad decrece, la vida media de este compuesto se acorta (Dobson y Tack, 1991).

1. 2. 2. 4. 3. Vegetación

El diclorvos ha sido detectado en plantas procedentes del sureste de China (Zhang y col., 2002). En general, las plantas toleran bien este compuesto, salvo los pepinos, rosas y algunos crisantemos (Kamrin, 2000).

1. 2. 3. DIMETOATO

1. 2. 3. 1. INTRODUCCIÓN

El dimetoato (O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato) (CASRN: 60-51-5) (Tabla 1.2) es un compuesto moderadamente tóxico (Clase II) según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002) y la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2007a). Es un insecticida organofosforado que actúa por contacto o sistémicamente sobre un amplio rango de insectos en agricultura, incluidas las avispas, las moscas blancas, piojos, etc. Se aplica, entre otros cultivos, sobre el olivar, viñedos, árboles frutales (manzanos, naranjos, etc.), melones, sandías, tomates, maizales, cultivos de alfalfa, algodón, trigo, soja y plantas ornamentales. Además este compuesto es utilizado en granjas para combatir a la mosca común y se le administra al ganado para el control de las larvas de moscas que actúan como parásitos.

1. 2. 3. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS

1. 2. 3. 2. 1. Toxicidad aguda

El dimetoato es moderadamente tóxico si se ingiere, inhala o se absorbe dermatológicamente. Este pesticida causa tanto estrés físico como bioquímico en los animales que son expuestos a él, produciendo modificaciones del electroencefalograma, la pérdida de peso en el hígado y bazo, así como la inhibición de la AChE. Esto último puede ocasionar problemas en la transmisión del impulso nervioso, lo que produce en el organismo afectado hiperexcitabilidad, convulsiones, parálisis muscular y fallo respiratorio. Además, el organismo intoxicado con dimetoato

puede desarrollar el síndrome intermedio (Hoffmann y Papendorf, 2006) y el síndrome parkinsoniano (Shahar y col., 2005).

1. 2. 3. 2. 2. Toxicidad crónica

Experiencias realizadas con ratas han demostrado que la exposición a diferentes concentraciones de este compuesto (0,6, 6 y 30 mg/kg) durante 30 días produce un incremento de los niveles de citocromo P450, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, catalasa y peroxidación lipídica, además del descenso de los niveles de glutatión y de la enzima AChE. A nivel histopatológico también se observan daños hepatocelulares y cambios isquémicos en el cerebro al incrementarse la dosis de dimetoato aplicada al animal (Sharma y col., 2005). Otros ensayos realizados sobre estos mismos animales muestran cambios bioquímicos como descenso de la insulina en plasma y el consiguiente aumento de la glucosa en sangre, al exponerlos a concentraciones de 21 mg/kg/día durante dos meses, además de cambios histopatológicos e histoquímicos en el páncreas (Hagar y Fahmy, 2002). Otros estudios confirman los daños que el dimetoato produce sobre el páncreas de las ratas y el incremento de la glucosa en sangre (Kamath y Rajini, 2007).

En cuanto a los estudios realizados en hombres adultos no mostraron ni efectos tóxicos ni anticolinesterásicos aquellos individuos que ingirieron 0,04 mg/kg/día durante cuatro semanas. Por otro lado, se observaron efectos sobre la inhibición de las enzimas ChE con concentraciones mayores o iguales a 30 mg/día durante 57 días (Kamrin, 2000).

Efectos sobre la reproducción: Este organofosforado puede dañar la función reproductora en algunos animales. Diversas investigaciones han demostrado que los organismos expuestos repetidamente al dimetoato experimentan un descenso de los niveles de testosterona en suero, así como en el peso testicular y en la movilidad del espermatozoide, incrementándose el porcentaje de mortalidad y anomalías del mismo (Salem y col., 1988; Afifi y col., 1991). Asimismo, se observan efectos adversos sobre el desarrollo reproductivo y la fertilidad de ratones macho expuestos a una dosis oral de 15 y 28 mg/kg/día durante 4 semanas (Faray y col., 2007).

El daño a la función reproductiva en humanos no ha sido probado bajo condiciones normales (Kamrin, 2000).

Efectos teratogénicos: algunos investigadores han señalado al dimetoato como un compuesto capaz de producir estos tipos de efectos. De hecho, se considera a este insecticida como teratogénico para gatos y ratas (Gallo y Lawryk, 1991), aunque dosis de 2,8, 3 o 6 mg/kg/día no presentan efectos teratogénicos sobre dichos animales. Sin embargo, las gatas preñadas expuestas a dosis de 12 mg/kg/día presentan un incremento en la incidencia de malformaciones en los recién nacidos y la misma dosis aplicada sobre las ratas produce deformaciones en su prole como enanismo (Kamrin, 2000). En otras experiencias realizadas en esta misma especie, no se observan efectos teratogénicos a las dosis estudiadas de 7,15 y 28 mg/kg/día (Farag y col., 2006). Asimismo, los descendientes de ratas embarazadas a las que se les suministra una concentración de 0,2 g/L de dimetoato en agua durante 10 días, muestran perturbaciones en el crecimiento, alteraciones en la composición mineral de los huesos de su prole y descenso del nivel de hormonas tiroideas en plasma (Mahjoubi-Samet y col., 2005).

En circunstancias normales, estos efectos son poco probables en los seres humanos (Kamrin, 2000).

Efectos mutagénicos: este organofosforado ha dado positivo en varios ensayos de mutagenicidad (OMS, 1989). Además los ratones expuestos a este compuesto han manifestado estos efectos, siendo su incidencia mayor cuando este compuesto se suministra en una dosis alta (Kamrin, 2000). De igual manera, se ha comprobado que el dimetoato incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el intercambio de cromátidas hermanas en los linfocitos periféricos de los trabajadores que aplican este compuesto (Rupa y col., 1991).

Efectos carcinogénicos: las ratas expuestas a dosis orales de 5, 15 o 30 mg/kg/día de dimeatoato durante más de un año presentan un incremento de tumores malignos. Sin embargo, este incremento no depende de la dosis empleada, es decir, altas dosis no significa una mayor tasa de tumores (Kamrin, 2000).

1. 2. 3. 2. 3. Destino en animales y humanos

El dimetoato es rápidamente metabolizado en mamíferos, aunque la tasa de eliminación y metabolización varía dependiendo de la especie estudiada. Las ratas excretan del 50 al 60% de las dosis administradas en orina, aire espirado y heces en

las 24 horas siguientes, mientras que los voluntarios humanos tratados con dimetoato excretaron del 76 al 100% de éste en ese mismo periodo de tiempo. Algunas de las especies de mamíferos probadas, muestran que este compuesto es menos tóxico en aquellos animales que tienen una relación más alta de hígado/cuerpo y una tasa alta de metabolización del dimetoato (Kamrin, 2000).

El dimetoato es metabolizado principalmente por desulfuración oxidativa e hidrólisis. La primera tiene lugar fundamentalmente en los insectos, mientras que en los mamíferos suele producirse la segunda. El producto obtenido tras la desulfuración oxidativa es el dimetoxón (ometoato), metabolito que parece ser el responsable de la acción tóxica del insecticida (Jokanovic, 2001). La detoxificación es llevada a cabo por esterasas mediante la formación de alquilfosfatos metilados (dimetilditiofosfato, dimetiltiofosfato, dimetilfosfato), siendo excretados en la orina.

1. 2. 3. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS

1. 2. 3. 3. 1. Efectos sobre las aves

El dimetoato ha sido utilizado desde mediados del siglo pasado en la agricultura, siendo potencialmente dañino para las aves (Brunet y col., 1997); éstas no pueden metabolizar el dimetoato tan rápidamente como los mamíferos, lo que le confiere una alta toxicidad (Kamrin, 2000). Las aves sometidas a altas concentraciones de este organofosforado presentan una reducción del consumo alimenticio y la inhibición de un 21-40% de la actividad AChE cerebral (Solecki y col., 2001).

1. 2. 3. 3. 2. Efectos sobre organismos acuáticos

El amplio uso de este compuesto unido a su alta solubilidad hace que pueda ser transportado con relativa facilidad a las aguas. Los organismos planctónicos presentes en los ecosistemas acuáticos reaccionan rápidamente a la llegada de contaminantes debido a su corto ciclo de vida y a su alta actividad metabólica, por lo que son muy útiles a la hora de detectar la llegada de un tóxico. En ensayos realizados en laboratorio se ha observado el efecto negativo del dimetoato sobre la producción primaria, lo que puede deberse a la inhibición por parte de este organofosforado de la síntesis de clorofila (Ratageri y col., 2006; Chen y col., 2007).

Otros organismos como los peces pueden verse afectados por la presencia de pesticidas en las aguas, ya que éstos pueden dañar el balance iónico de algunos sistemas biológicos. Por este motivo se ha estudiado el efecto que el dimetoato puede producir en diferentes iones presentes en el pez *Cyprinus carpio*. (Logaswamy y col., 2007). La alteración de iones puede ocasionar importantes efectos negativos para el organismo que lo sufre, ya que están implicados en muchos procesos esenciales para la vida. Además, el caracol de agua *Lymnaea acuminata* expuesto a este compuesto ve reducida de forma significativa su fecundidad y la tasa de supervivencia de sus embriones, así como la actividad de diversas enzimas presentes en él, como la AChE o las fosfatasas (Tripathi y Singh, 2003)

1. 2. 3. 3. 3. Efectos sobre otros organismos (especies no diana)

El dimetoato es considerado un insecticida de amplio espectro, cuyos efectos tóxicos se dejan sentir en especies no diana como los artrópodos terrestres (Hamers y Krogh, 1997; Martikainen y col., 1998). Su efecto sobre estas especies puede llegar incluso a cambiar la estructura de una comunidad como los colémbolos; estos organismos son los encargados de los procesos de descomposición y del reciclaje de nutrientes (Endlweber y col., 2006). Del mismo modo, las lombrices de suelo, los caracoles y las arañas entre otros, se ven afectados por la aplicación de este compuesto al vivir en contacto directo con el suelo (Kula y Larink, 1997; Coeurdassier y col., 2002; Pedersen y col., 2002). La especie *Helix aspersa* muestra inhibición de la AChE en los individuos expuestos simulando condiciones que podrían darse en el medio natural (Coeurdassier y col., 2002). Asimismo, la araña *Pardosa pratvaga* habitual de los campos europeos, puede verse afectada por dimetoato, aunque como se ha demostrado en experiencias realizadas en el laboratorio, estos efectos dependen del estado nutricional del organismo. A su vez, la cantidad y la variabilidad de las presas pueden verse afectadas por la aplicación de este compuesto, lo que obstaculiza la recuperación de la población de arañas (Pedersen y col., 2002). En el caso de *Coccinella septempunctata*, tanto los adultos como las larvas se ven afectados por la aplicación del dimetoato sobre los campos. Estos organismos son predadores, y han sido utilizados como agentes de biocontrol para combatir a la avispa *Acyrtosiphon pisum*. Este organofosforado provoca la alteración del comportamiento depredador de esta especie y su capacidad para detectar a sus presas (Singh y col., 2004).

1. 2. 3. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL

1. 2. 3. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas

La acción de los microorganismos va a jugar un papel destacado en la vida media del dimetoato sobre el suelo (Sánchez y col., 2004), pudiendo variar entre unos 158 días en suelos estériles y ácidos, y 2 días en presencia de microbiota y humedad (USEPA, 2007a).

En general, el dimetoato tiene una baja persistencia en el medio. Por otro lado, este compuesto es altamente soluble en agua, siendo adsorbido muy débilmente sobre las partículas sólidas, lo que lo hace susceptible de sufrir procesos de filtración (Kamrin, 2000). De hecho, este pesticida ha sido detectado en muestras de aguas subterráneas recogidas en otoño en el norte de la Patagonia argentina (Loewy y col., 2003) y en las procedentes del Valle Jordán, siendo las concentraciones encontradas en las muestras de este último lugar más bajas de lo esperadas, lo que puede deberse a la naturaleza arcillosa del suelo y a su alto contenido orgánico, el cual actúa como purificador, evitando la llegada de este compuesto a las aguas subterráneas (Al Kuisi, 2002). De igual forma, otro estudio realizado en el oeste de Australia, apunta a las características del suelo para explicar la ausencia de dimetoato en las muestras recogidas en los acuíferos de la zona, aún cuando se hallaba presente en algunos suelos (Salama y col., 2005).

1. 2. 3. 4. 2. Aguas superficiales

El dimetoato una vez presente en las aguas, está sujeto a procesos como la hidrólisis, especialmente en aguas alcalinas. Su vida media en agua de río es aproximadamente de ocho días, lo que puede deberse, además de a la degradación química, a la acción de los microorganismos (Kamrin, 2000).

A pesar de que su vida media en este medio es relativamente breve, se han encontrado restos de este compuesto en las aguas de El-Moheet en el área de Giza (Egipto) (El-Kabbany y col., 2000) y en altas concentraciones en las aguas del río Elva (Götz y col., 1998) y del río Wuchuan (China) (Zhang y col., 2002).

1. 2. 3. 4. 3. Vegetación

Aunque es un pesticida relativamente no tóxico para las plantas, y no parece afectar a la germinación de las mismas, se ha observado una reducción del crecimiento de las semillas de algunas plantas (Hanley y Whiting, 2005). Por otro lado, se ha detectado la presencia de residuos de este compuesto en varias muestras de aceite de oliva (Rastrelli y col., 2002; Dugo y col., 2005). Los olivares, que poseen una gran importancia económica y cultural en los países mediterráneos, se ven afectados por la mosca del olivo *Bactrocera (dacus) oleae*, siendo el dimetoato el pesticida más utilizado para combatir a este insecto. Sin embargo, los residuos de este organofosforado pueden permanecer en la oliva y contaminar el producto que de ella se obtiene, el aceite. Por este motivo tanto la Unión Europea como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han establecido límites máximos para los residuos de este pesticida tanto en la oliva como en el aceite de oliva. En otras regiones del mundo como China, donde este compuesto es ampliamente utilizado, se han detectado áreas en las que su concentración excede los límites recomendados y suponen un riesgo para la población que se alimenta de las plantas cultivadas en estas zonas (Zhang y col., 2002; Bai y col., 2006). Igualmente, en países como Alemania se ha detectado la presencia por encima de los límites de ingesta diaria admisible (ADI 2µg/kg peso corporal) de este compuesto en la dieta de los niños (Becker y col., 2006).

1. 2. 4. PARATIÓN

1. 2. 4. 1. INTRODUCCIÓN

El paratión o etil paratión (O,O-dietil O-4-nitrofenil fosforoditioato) (CASRN: 56-38-2) (Tabla 1.2) descrito por Gerhard Schrader en 1944 fue uno de los primeros insecticidas comercializados (Stenersen, 2004). Este compuesto organofosforado ha sido utilizado para el control de varios tipos de insectos y ácaros (UNEP/FAO 2004). Su alta toxicidad para los mamíferos ha motivado su sustitución por otros OF menos tóxicos (Timbrell, 2001) e incluso su prohibición para ciertos cultivos frutícolas, frutos secos y cereales (USEPA, 1999).

Posee una alta presión de vapor y puede intoxicar tanto a insectos como a vertebrados a través del sistema respiratorio.

1. 2. 4. 2. EFECTOS TOXICOLÓGICOS

1. 2. 4. 2. 1. Toxicidad aguda

Los ensayos realizados sobre ratas a las que se les inyectó una única dosis de paratión (6,6 mg/kg) mostraron síntomas severos de toxicidad tan solo 4 horas después del tratamiento, llegándose a observar la muerte de un número importante de los individuos tratados. Los sobrevivientes presentaron signos de intoxicación como temblores, exceso de salivación, lagrimeo, defecación y micción durante los dos primeros días tras la exposición. Además se observó un importante descenso de la actividad colinesterasa de hasta un 82% (Liu y Pope, 1998). Por otro lado, este compuesto puede provocar cambios de la actividad nocturna de estos animales cuando se exponen a dosis de 18 y 27 mg/kg (Karanth y col., 2007).

La vía más habitual de exposición para los trabajadores a este pesticida es por la piel debido a su baja volatilidad y a sus propiedades lipofílicas (Gosselin y col., 2005). Además, el paratión es uno de los OF más tóxicos, estando frecuentemente implicado en casos de suicidio (Lacassie y col., 2001; Hoffmann y Papendorf, 2006) e incluso en asesinatos (Karger y col., 2004), siendo la oral la vía de exposición más utilizada en estos casos.

Los signos clínicos de intoxicación aparecen habitualmente cuando se produce un 60 o 70% de la inhibición de la actividad colinesterasa presente en los glóbulos rojos (Sidell, 1994). Los individuos expuestos a este compuesto presentan bradicardia, hipotensión, vómitos, náuseas, miosis, sudoración, debilidad, parálisis de los músculos respiratorios, ansiedad, confusión, convulsiones y coma (Lacassie y col., 2001; Hoffmann y Papendorf, 2006). Además, el paratión está relacionado con la aparición del síndrome intermedio (Can y col., 2001).

1. 2. 4. 2. 2. Toxicidad crónica

En principio se pensó que el paratión podría ser uno de los compuestos que producían la neuropatía retardada, sin embargo esto no ha podido ser confirmado por los estudios realizados en pollos expuestos a diferentes dosis de paratión de forma continuada (Soliman y col., 1982).

Efectos sobre la reproducción: El paratión puede atravesar la placenta una vez que entra en el torrente sanguíneo (EXTOXNET, 1993).

Efectos teratogénicos: No se han encontrado evidencias al respecto (UNEP/FAO 2004), aunque se ha observado la aparición de malformaciones tras una exposición crónica a este compuesto (Ray y Richards, 2001), la aparición de abortos y muertes postnatales en ratas y la reducción de la ganancia de peso en los supervivientes destetados (De Silva y col., 2006).

Efectos mutagénicos: las evidencias parecen indicar que el paratión no interacciona con el material genético. De hecho, los cultivos celulares de mamíferos y bacterias expuestos a paratión no presentan mutaciones y no se observan otros daños como la inhibición o sobreestimulación del ADN reparador, daños cromosómicos en ratones o en las células sanguíneas del hombre (UNEP/FAO, 2004).

Efectos carcinogénicos: Este compuesto puede ser potencialmente cancerígeno (EXTOXNET, 1993), aunque en los estudios realizados al respecto no se observan estos efectos (UNEP/FAO, 2004). De hecho, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica al paratión dentro del grupo 3, es decir, sustancia clasificada como no cancerígena para los humanos (IARC, 1983).

1. 2. 4. 2. 3. Destino en animales y humanos

El Paratión es rápidamente absorbido por las rutas de exposición habituales es decir oral, dérmica e inhalatoria (UNEP/FAO, 2004). Una vez absorbido este compuesto puede ser almacenado en los tejidos lipídicos o puede ser biotransformado principalmente en el hígado, donde este compuesto es metabolizado a *p*-nitrofenol, dietil fosforotionato y paraoxón. En general, estos metabolitos son compuestos más fácilmente excretados en la orina y en las heces (Mutch y Daly, 2003; Gosselin y col., 2005).

1. 2. 4. 3. EFECTOS ECOLÓGICOS

1. 2. 4. 3. 1. Efectos sobre las aves

El paratión es uno de los pesticidas más utilizados en los campos agrícolas de la isla de Tenerife, por este motivo se realizó un estudio sobre el efecto de este compuesto sobre dos especies de aves que habitan en la isla, *Sylvia melanocephala* y *Serinus canaria*. Estas dos especies mostraron una ligera inhibición de las enzimas ChE del suero tras la fumigación con paratión (Sanchez y col., 1997). Por otro lado, en Dakota del Norte (Estados Unidos) se evaluó el efecto del tratamiento aéreo con paratión sobre las aves que habitan en los humedales de la zona. Así se trató la mitad de un campo de girasoles con una dosis de paratión de 1,12 kg ia/ha (máxima dosis permitida para este cultivo en Dakota) sin evitar que cayera en los estanques de la zona, mientras que en la otra mitad se evitó la fumigación de los embalses. Trascurridos tres días desde el tratamiento se observó una mortalidad del 90% en los patos de la zona tratada. Estas aves presentaban una inhibición de la actividad colinesterasa del 76% con respecto a las aves recogidas en la zona control. Asimismo, se recogieron muestras de agua, cultivos, insectos y caracoles, constatándose la presencia de residuos de paratión en todas ellas. Estos resultados mostraron la necesidad de evitar la aplicación aérea de los OF sobre los pequeños humedales, con ello se reduce la presencia de estos compuestos en agua, eliminándose la mortalidad de aves por esta causa (Hill, 2003).

1. 2. 4. 3. 2. Efectos en organismos acuáticos

Los peces y los invertebrados expuestos a este compuesto suelen presentar una disminución de la actividad y anorexia. Sin embargo, el pez *Danio rerio* expuesto a distintas concentraciones de paratión durante unos 250 días, muestra un incremento de la tasa de alimentación, lo que podría deberse al incremento de la actividad general del pez (Roex y col., 2003). Otros peces como *Carassius auratus*, tras 24 horas de exposición a la CL₅₀ de 6,46 mg/L muestran cambios fisiológicos y de comportamiento (Ferrari y col., 2004a). Del mismo modo el pez *Ictalurus punctatus* muestra signos de intoxicación como aletargamiento y cambios de comportamiento, transcurrida una hora desde su exposición (Straus y Chambers, 1995). Los macroinvertebrados acuáticos también se han visto afectados por este compuesto, que ha sido detectado en importantes concentraciones en su medio (Schulz y Liess, 1999).

1. 2. 4. 3. 3. Efectos sobre otros organismos (especies no diana)

El paratión es aplicado sobre las plantaciones de banana y sobre los viñedos de las Islas Canarias, donde habita el reptil *Gallotia galloti*. En estas zonas, se observó que este reptil era resistente a la intoxicación con este compuesto, aunque su toxicidad puede estar influenciada por la temperatura ambiente durante su aplicación y por el propio metabolismo del animal (Sanchez-Hernández y Walker, 2000).

1. 2. 4. 4. DESTINO MEDIOAMBIENTAL

1. 2. 4. 4. 1. Suelos y aguas subterráneas

Este compuesto es retenido en las partículas del suelo, donde es degradado mediante procesos biológicos y químicos durante varias semanas. Los residuos del paratión pueden permanecer durante años a profundidades de mayores de 15 cm. En los suelos superficiales, este organofosforado sufre el proceso de fotodegradación, ya que la luz solar puede potenciar la transformación de paratión a paraoxón (EXTOXNET, 1993).

Por otro lado, su presencia en aguas subterráneas puede deberse a su filtración a través del suelo (Nowakowska y col., 2005).

1. 2. 4. 4. 2. Aguas superficiales

La concentración de paratión en las muestras de agua suele ser baja, debido a su alto poder de sorción sobre el carbono orgánico de las partículas presentes en el suelo (Berenzen y col., 2005). A pesar de ello, el paratión ha sido detectado en diversos lugares como en el río Kalamas (Grecia) en concentraciones de 0,01 µg/L durante los meses de verano (Lambropoulou y col., 2002) y en las muestras de agua recogidas en el área agrícola de Braunschweig (Alemania) en concentraciones de 0,3 µg/L (Berenzen y col., 2005), llegándose a detectar concentraciones de hasta 6 µg/L en algunas muestras de agua recogidas en el norte de Alemania (Schulz y Liess, 1999).

1. 2. 4. 4. 3. Vegetación

Las plantas examinadas después de la aplicación de paratión sobre cultivos de cebada revelan una baja concentración de este compuesto (0,32 a 1,82 µg/g), al igual que en las muestras recogidas en los setos de la zona, en los que la concentración de paratión es de 0,07 µg/g, descendiendo hasta un valor de 0,02 µg/g unas 16 horas después de la aplicación (Klöppel y Kördel, 1997). Asimismo, las hierbas medicinales de Brasil presentan concentraciones bajas de este compuesto (Zuin y col., 2003). Sin embargo, las medidas realizadas en muestras de vegetales en el área de Shaanxi (China) revelaban elevados niveles de paratión, los cuales excedían los niveles de residuos máximos permitidos para este compuesto (Bai y col., 2006).

1. 3. LAS ENZIMAS COLINESTERASAS

1. 3. 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas denominadas esterasas son las encargadas de la hidrólisis de los enlaces tipo éster, estando constituidos por la unión de ácidos orgánicos o inorgánicos con alcoholes o tioles de diferente naturaleza.



La clasificación de las enzimas esterasas es complicada y no está exenta de cierto debate. Tradicionalmente estas enzimas se han clasificado, desde un punto toxicológico, dependiendo de su reactividad frente a los OF, tal y como postuló Aldridge (1953):

- **Esterasas A:** son capaces de hidrolizar ésteres derivados de compuestos aromáticos, pero no son inhibidas por estos compuestos. Incluidas en esta categoría se encuentran las hidrolasas de triéster fosfórico, que hidrolizan paraoxón y otros triésteres organofosforados neutros y la diisopropil-fluorofosfatasa, que hidroliza al compuesto fluorofosfato (DFP).
- **Esterasas B:** hidrolizan ésteres con radicales alquílicos y son inhibidas por compuestos como los organofosforados o los carbamatos. En este grupo de enzimas denominadas serina hidrolasas se encuentran: acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE), carboxilesterasa (CaE) y esterasa neurotóxica (NTE).
- **Esterasas C:** prefieren los ésteres acetato como sustrato y no se unen a los OF.

1. 3. 2. COLINESTERASAS

Las enzimas colinesterasas (ChE) están presentes tanto en vertebrados como en invertebrados y se distinguen de otras esterasas en su preferencia por la hidrólisis de ésteres de colina y en la inhibición que sufren tras ser expuestas a fisostigmina o eserina (Eto, 1974).

La clasificación de las ChE en vertebrados parece clara. Dependiendo de sus propiedades catalíticas, la afinidad hacia ciertos sustratos y la susceptibilidad a inhibidores selectivos, se distinguen dos grupos homólogos: la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa. La AChE se inhibe ante un exceso de sustrato y el inhibidor específico BW284c51 (1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-uno dibromuro), mientras que el iso-OMPA (tetraisopropilo pirofosforamida) es un inhibidor específico de la BChE. En el caso de los invertebrados, esta clasificación parece complicarse al presentar propiedades atípicas, como la preferencia parcial por varios sustratos y un comportamiento diferente al esperado con los inhibidores selectivos (Bocquené y col., 1997a; Varò y col., 2002; Cunha y col., 2007; Gagnaire y col., 2008).

Las distintas formas de ChE poseen el mismo dominio catalítico, la estructura tridimensional del cual manifiesta un centro activo que reside en la base de una estrecha y profunda cavidad de cerca de 20 Å (Sussman y col., 1991), formada por anillos de residuos aromáticos, denominada *garganta catalítica* (Figura 1.5). En la base de esta garganta se encuentran los residuos de la tríada catalítica: serina 203, histidina 447 y glutamato 334. La hidrólisis del sustrato natural de la AChE (acetilcolina) se produce porque la histidina próxima al residuo de serina atrae a los protones procedentes del grupo hidroxil de la serina, facilitando la ionización y el ataque electrofílico de la acetilcolina. A continuación, el enlace éster se rompe y el residuo de serina se acetila, liberándose la colina. Por último, el acetato es liberado de la enzima y la serina recobra un protón, recuperándose la actividad enzimática (Walker, 2001). La reactivación de la enzima ocurre con mucha rapidez si el sustrato es la acetilcolina (tiempo de recambio ~150 µs), pero en el caso de que sean compuestos carbamatos u organofosforados los que actúen como sustratos, la enzima carbamilada o fosforilada es reactivada más lentamente (Gupta, 2007). Por ejemplo, a diferencia de la enzima acetilada, la AChE carbamilada es mucho más estable, con un tiempo medio para la hidrólisis de ~15-30 min. *In vivo*, la duración de la inhibición por los agentes carbamilantes es de tres a cuatro horas (Taylor, 1996). En el caso de los inhibidores organofosforados, el oxígeno del fosforilo se fija dentro del agujero oxianiónico del centro activo y el grupo de salida está orientado hacia la abertura de la garganta. La enzima fosforilada es altamente estable y su hidrólisis es considerablemente más lenta ($t_{1/2}$ ~horas-días). Los grupos alquilo secundarios o terciarios propician en mayor grado la estabilidad de la enzima fosforilada, y no se observa regeneración importante de la enzima activa, de modo que el retorno de la

actividad enzimática fosforilada es fomentada aún más por “envejecimiento” que es el resultado de la pérdida de uno de los grupos alquilo (Aldridge, 1976).

Las enzimas AChE y BChE difieren en el volumen del bolsillo o saco acilo que acomoda al grupo de esta naturaleza del sustrato, siendo más grande en el caso de la BChE, lo cual explicaría el hecho de que la AChE hidrolice la ACh pero no la butirilcolina (BCh), mientras que la BChE puede hidrolizar ambos sustratos así como otros ésteres. Esta diferencia también explicaría por qué la BChE es sensible a inhibidores de gran tamaño como el iso-OMPA, mientras que la AChE no lo es (Massoulié, 2000).

Por otro lado, existen distintos sitios de fijación en la AChE para ligandos inhibidores que fundamentan las diferencias de especificidad entre la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa: el saco acilo del centro activo, el subsitio de la colina sobre el centro activo y el sitio aniónico periférico (Taylor y Radić, 1994). Según el sitio de unión a la enzima, los compuestos inhibidores de las ChE se clasifican en diferentes grupos (Massoulié, 2000):

- a) Inhibidores que se unen al centro activo propiamente (subsitio de colina). Dentro de este grupo se encuentran los ligandos no-covalentes, como el edrofonio y la tacrina, y los pseudosustratos o inhibidores covalentes, que sulfonilan, fosforilan o carbamilan la serina activa; estos últimos incluyen, respectivamente, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo, los inhibidores organofosforados y los carbamatos como la eserina.
- b) Inhibidores reversibles que no penetran en el lugar activo sino que se unen al sitio periférico localizado a la entrada de la garganta catalítica, como el propidio y la toxina peptídica fasciculina.
- c) Inhibidores que se unen simultáneamente al sitio activo y periférico, como, por ejemplo, el compuesto BW284c51.

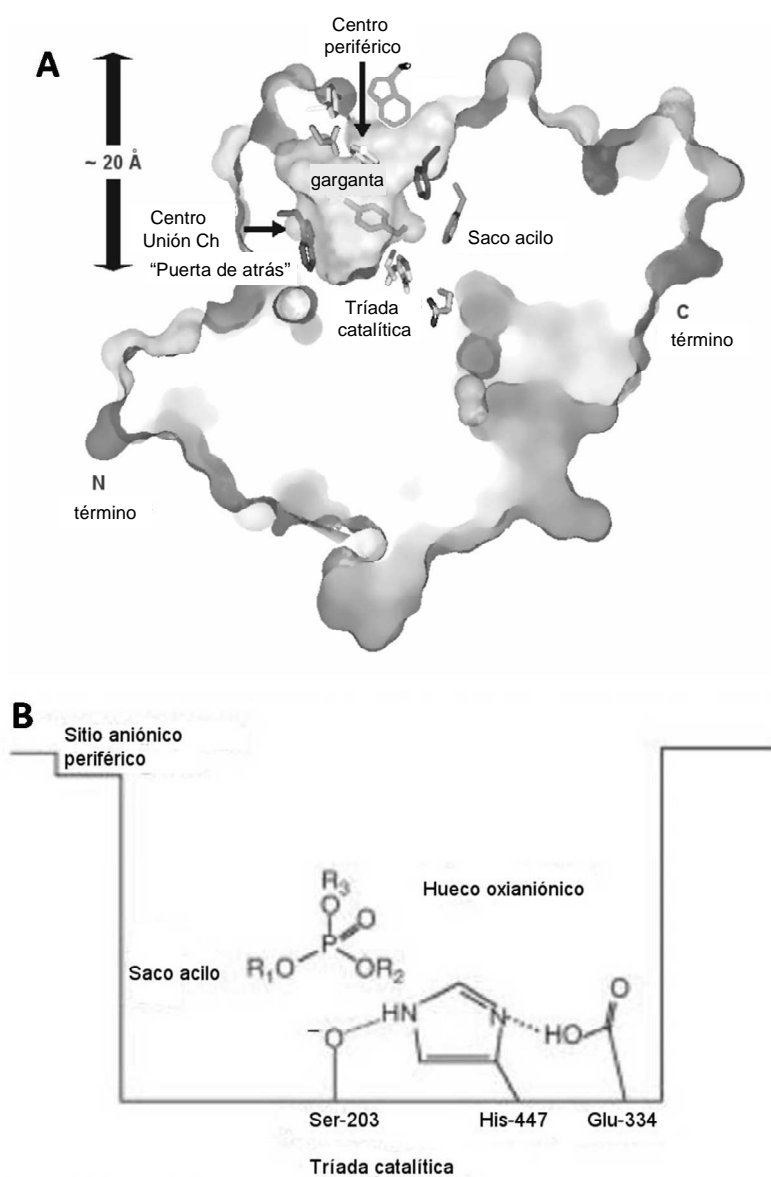


Figura 1.5. Dibujo esquemático de A) la molécula de AChE (Reiner, 2000) y B) del lugar activo de la AChE en el que se ha introducido una molécula de un organofosforado (R_1 y R_2 son cadenas alquílicas y R_3 es el grupo saliente) (Gupta, 2007).

1. 3. 2. 1. ACETILCOLINESTERASA

La enzima acetilcolinesterasa está ampliamente distribuida tanto en el reino animal como vegetal. En la mayoría de los animales se halla en tejidos nerviosos y no nerviosos, aunque su función en éstos no ha sido totalmente esclarecida (Stenersen, 2004). Asimismo, se encuentra presente en músculo, sangre, plasma, linfocitos y eritrocitos de los vertebrados (Szelenyi y col., 1982; Brimijoin, 1983; Sturm y col., 1999) y en la hemolinfa de los invertebrados (Lundebye y col., 1997; Owen y col., 2002).

La AChE desempeña un importante papel en la neurotransmisión. Su principal función es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis. El éster acetilcolina es el responsable de la transmisión fisiológica del impulso nervioso. Este neurotransmisor se libera en las terminaciones de las fibras colinérgicas, como respuesta a la conducción de un potencial de acción y contacta con los receptores colinérgicos en la superficie de la célula diana, produciéndose la transmisión del impulso. Una vez que la acetilcolina se libera del receptor, es hidrolizada por la AChE, lo que produce la brevedad y la unidad de cada impulso propagado.

Sin embargo, se ha sugerido la posibilidad de que esta enzima pudiera desempeñar otras funciones como la de receptor fisiológico. Ésta se ha definido tradicionalmente como una enzima de membrana postsináptica, pero se ha demostrado que está asociada a terminales presinápticos. Esta AChE presináptica podría regular la síntesis de la acetilcolina mediante un mecanismo de retroacción, además de regular la liberación de la acetilcolina de los terminales nerviosos, mediante la regulación de la unión de ésta a los receptores presinápticos (Repetto M., 1995). Por otro lado, la AChE de los invertebrados parece desempeñar funciones muy diversas; se la relaciona con actividades locomotoras y reproductoras, además de tener un papel destacado en el desarrollo embrionario y larvario (Corsi y col., 2007).

1. 3. 2. 2. BUTIRILCOLINESTERASA

La butirilcolinesterasa es considerada una esterasa inespecífica al hidrolizar gran variedad de sustratos ésteres, motivo por el cual se la conoce también como pseudocolinesterasa o succinilcolinesterasa.

Esta enzima es sintetizada en el hígado y se encuentra en el plasma y en otros tejidos como músculo, mucosa intestinal y sistema nervioso central de los vertebrados (Lockridge y col., 1987; Walker y Thompson, 1991). Los peces, poseen BChE en el hígado y en el plasma, encontrándose además en el músculo (Sturm y col., 2000; Varò y col., 2003), en el páncreas y en el corazón de algunas especies (Das y col., 2004). En invertebrados, como *Mytilus galloprovincialis*, esta enzima se encuentra mayoritariamente en el aparato digestivo (Escarpín y Ponte, 1997).

A pesar de su amplia distribución en los principales tejidos de los animales, su función biológica no ha sido determinada con claridad. Muchas han sido las funciones atribuidas a esta enzima, aunque no todas tienen consistencia. Diversos autores han formulado la posibilidad de que la BChE fuera precursora de la AChE, basándose en la semejanza estructural de ambas proteínas, en la similitud de sus centros activos y de las reacciones inmunitarias en las colinesterasas de distintas especies a lo largo de la escala filogenética. Sin embargo, esto no ha podido probarse, ya que existen evidencias inmunoquímicas de las diferencias estructurales entre ambas enzimas y no explicaría el papel de la BChE en tejidos no nerviosos. Otra posible función de esta enzima estaría relacionada con el mantenimiento de la vaina de mielina; pero como no todos los agentes capaces de inhibir su actividad enzimática son agentes desmielinizantes, esta posibilidad parece remota. También se le ha atribuido un papel importante en el mecanismo de defensa de la célula frente a la formación de butirilcolina y de otros ésteres de colina en el metabolismo de los ácidos grasos, protegiéndola de esta forma de los efectos tóxicos no deseados y de la inhibición de la AChE por la acción de estos productos. Esta función no se llevaría a cabo en todo el organismo, ya que no todos los tejidos contienen colinas hidrosolubles del tipo de la butirilcolina (Repetto M., 1995). Quizás una de las ideas más extendidas sea la posibilidad de que esta enzima actúe como protector de la AChE, evitando la inhibición de la misma. Esta posibilidad parece consolidarse ya que se ha demostrado que la BChE tiene un efecto protector frente a la intoxicación por OF, al administrarse como tratamiento profiláctico en ratas, cobayas y primates (Raveh y col., 1997; Allon y col., 1998; Mehrani, 2004). Asimismo, se ha aludido a la posibilidad de que la BChE sirva de apoyo a la AChE en la transmisión del impulso nervioso. Esta propuesta se ha basado en la existencia de ratones knockout que careciendo de actividad AChE son capaces de alcanzar la madurez. Sin embargo, estos ratones mueren cuando se induce la inhibición de la BChE, lo que parece sugerir que en estos animales la BChE termina la transmisión del impulso nervioso mediante la hidrólisis de la acetilcolina

(Lockridge y col., 2005). Por último, la BChE parece estar relacionada con la destoxificación de las toxinas de origen vegetal y de fármacos, siendo una enzima importante en la hidrólisis del relajante muscular succinilcolina y de algunos anestésicos locales como la procaína (Goodall, 2006). En humanos, esta enzima contribuye a la inactivación del péptido ghrelin, el cual estimula el crecimiento mediante las hormonas liberadas de la pituitaria, aunque estudios recientes señalan la necesaria presencia de otro sistema enzimático que ayude en esta función a las BChE (De Vriese y col., 2004).

1. 3. 3. CARBOXILESTERASAS

Las enzimas carboxilesterasas constituyen un grupo heterogéneo de isoenzimas que catalizan la hidrólisis de un amplio rango de ésteres endógenos y exógenos. Su distribución dentro de los mamíferos es muy amplia, encontrándose los niveles más altos en plasma e hígado (Gupta, 2004; Satoh y Hosokawa, 2006).

Estas enzimas destoxifican a los carbamatos y organofosforados a través de dos mecanismos: 1) por hidrólisis directa de los enlaces éster en las moléculas de los insecticidas que los contienen 2) por fosforilación estequiométrica de la enzima, proporcionando así lugares alternativos de unión, disminuyendo la concentración del inhibidor en circulación e impidiendo que éste alcance el lugar activo de la AChE (Jokanovic, 2001; Sogorb y Vilanova, 2002). Este sistema de destoxificación se ha demostrado muy eficaz sobre todo en ciertas cepas de insectos que se han hecho resistentes al haber sobreexpresado estas enzimas que actúan como “scavengers” de compuestos organofosforados (Smyth y col., 1994; Prabhakaran y Kamble, 1996). Asimismo, las CaEs están implicadas en los mecanismos de destoxificación, por hidrólisis, de los insecticidas de tipo piretroide (Sogorb y Vilanova, 2002).

1. 3. 4. ESTERASA DIANA DE NEUROPATÍA

La NTE es una proteína integral de la membrana presente en las neuronas y en otro tipo de tejidos no neuronales (Moretto y Lotti, 2006) como el corazón, bazo y linfocitos (Stenersen, 2004). Esta enzima es considerada la diana molecular del mecanismo por el que algunos plaguicidas inducen el síndrome neurológico conocido como polineuropatía retardada (OPIDP). Estudios experimentales han evidenciado que la principal lesión es un cambio degenerativo bilateral en las porciones distales de

los axones y sus terminales, afectando principalmente a las fibras nerviosas mielinizadas centrales y periféricas más largas, provocando la rotura de los segmentos neuríticos y de sus vainas de mielina (Costa, 2006).

Algunos OF, dependiendo de su estructura química, así como algunos carbamatos y fluoruros de sulfonilo pueden inhibir la NTE (Jokanovic y col., 2002). La fosforilación de la NTE por los organofosforados es similar a la observada para la AChE. Sin embargo, solo aquéllos cuya estructura química conduce al envejecimiento de la NTE fosforilada pueden provocar OPIDP. Otros compuestos que inhiben la NTE pero que no sufren la reacción de envejecimiento no son neuropáticos indicando que la inhibición de la actividad catalítica de la NTE no es el mecanismo de degeneración axonal. Para que se inicie la OPIDP, es necesaria la fosforilación y posterior envejecimiento de al menos un 70% de la NTE. Esto es lo que ocurre con inhibidores como fosfatos, fosfonatos y fosforamidatos. Otro tipo de compuestos como fosfinatos, carbamatos y haluros de sulfonilo, que inhiben la NTE, provocan la promoción de la OPIDP o bien suponen una protección frente a la misma cuando se administran tras o antes de un organofosforado neuropático, respectivamente (Jokanovic y col., 2002). De esta manera, los agentes que inhiben la NTE pero no el proceso de envejecimiento, ejercen un papel protector al ocupar el lugar activo de la NTE.

1. 3. 5. DIVERSIDAD DE LAS COLINESTERASAS EN LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS

En la mayoría de los peces teleósteos, el tejido cerebral contiene predominantemente acetilcolinesterasa (Kozlovskaya y col., 1993; Sturm y col., 1999). La butirilcolinesterasa se encuentra principalmente en el suero, pero también está presente en el hígado, músculo y otros tejidos. Así, se ha demostrado que el suero de algunos ciprínidos contiene tanto AChE como BChE, mientras que la carpa común (*Cyprinus carpio* L.) y otros representantes de las familias de los pércidos y esócidos poseen únicamente AChE (Kozlovskaya y col., 1993; Chuiko, 2000; Chuiko y col., 2003). El músculo axial puede contener exclusivamente AChE, como en muchos teleósteos dulceacuícolas, o ambas enzimas, como en la mayoría de las especies marinas (Leibel, 1988; Kozlovskaya y col., 1993; Sturm y col., 1999; Chuiko, 2000).

En el caso de los invertebrados acuáticos, a diferencia de los vertebrados, la variedad de este tipo de enzimas parece ser mayor. Por ejemplo, la actividad

colinesterasa presente en el crustáceo *Callinectes sapidus* se debe principalmente a la AChE (Monserrat and Bianchini, 2000). Existen asimismo evidencias de su presencia en otros invertebrados como *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea virginica*, *Penaeus* spp., *Metapenaeus monoceros*, *Paratya australiensis*, *Palaemonetes pugio*, *Adamussium colbecki* y *Palaemon seratus* (Mora y col., 1999; Fulton y Key, 2001; Corsi y col., 2004; Frasco y col., 2006). En cambio, las enzimas colinesterasas de otros organismos *Corbicula fluminea*, *Artemia parthenogenetica*, *Monodonta lineata* o *Nucella lapillus* no pueden clasificarse ni como AChE ni como BChE, tal y como se hace en vertebrados, al mostrar características atípicas como cierta preferencia por el sustrato propionilcolina, más que por la acetilcolina y la butirilcolina (Walker y Thompson, 1991; Mora y col., 1999; Varò y col., 2002; Cunha y col., 2007).

La determinación del tipo de ChE que predomina en los tejidos de cada especie es fundamental para decidir cual es el sustrato y la concentración adecuada para la medida de la actividad colinesterasa. Su conocimiento permite mejorar la herramienta de biomonitorización basada en la sensibilidad de las ChE, optimizando las condiciones para cada especie (Walker y Thompson, 1991; Sturm y col., 1999).

1. 3. 6. FUENTES DE VARIACIÓN EN LA ACTIVIDAD COLINESTERASA

Las enzimas colinesterasas son utilizadas como biomarcadores específicos de compuestos organofosforados y carbamatos, ya que se inhiben en presencia de estos pesticidas. Sin embargo, estas enzimas pueden verse afectadas por factores naturales como los tejidos utilizados, la especie elegida, la genética, la edad, el género y/o estado reproductivo, la regulación endocrina e incluso los ritmos circadianos y circanuales. Así como de otros factores como la temperatura ambiental, el estado nutricional y de salud de los organismos (Rattner y Fairbrother, 1991) o la presencia en el medio de metales o biotoxinas (Monserrat y col., 2001; Cunha y col., 2007).

Entre los tejidos más utilizados en el diagnóstico de la intoxicación por OF se encuentran el cerebro, el hígado, la sangre, el plasma y el suero. Sin embargo, existen otras fuentes en los organismos que contienen ChE como los eritrocitos o las plaquetas. La actividad de estas enzimas puede variar considerablemente de unos tejidos a otros. Por ejemplo, la actividad colinesterasa del cerebro medio de *Sturnus vulgaris* es cinco veces mayor que la del cerebelo (Rattner y Fairbrother, 1991). Asimismo, la actividad colinesterasa observada en las branquias de *Perna viridis* es

entre dos y cinco veces más alta que en el resto de los tejidos del organismo (Lau y col., 2004). De igual manera, la actividad de las ChE presentes en la hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* es mayor que la encontrada en las branquias, glándulas digestivas y complejo manto/gónada (Dailianis y col., 2003).

La variación de actividad colinesterasa entre las diferentes especies ha sido recogida en numerosos trabajos. Estas diferencias han sido atribuidas en ocasiones a la existencia de diversas formas de ChE. De este modo, la distinta sensibilidad observada en peces ante diversos agentes anticolinesterásicos, se ha atribuido a las diversas formas de ChE presentes (Sturm y col., 1999). Asimismo, existen diferencias importantes entre los teleósteos de agua dulce, no solo en la actividad registrada, sino también en el tipo de ChE presente. Así, los peces de la familia ciprinidae muestran una alta actividad AChE cerebral, y cuentan con AChE y BChE en su plasma. Sin embargo, la actividad AChE cerebral varía apreciablemente de unas especies a otras dentro de la misma familia, y algunas de ellas carecen de BChE en plasma (Chuiko y col., 2003).

La genética es un factor que hay que tener presente a la hora de comprender las variaciones producidas en la actividad de las ChE, ya que se ha observado niveles distintos de actividad en individuos de la misma especie; estas variaciones se pueden deber a bases genéticas (Rattner y Fairbrother, 1991), como se aprecia en la variación genética de la BChE en humanos que afecta a la respuesta de los individuos a los diferentes agentes xenobióticos (Goodall, 2006).

Por otro lado, la aplicación intensiva de estos compuestos ha provocado el desarrollo de sistemas de resistencia por parte de los organismos diana de los pesticidas; estos sistemas de resistencia parecen estar relacionados con la mutación genética de las ChE (Villatte y col., 2000). En ocasiones, esta mutación consiste en la sustitución de un aminoácido específico en la AChE; y en otras, la mutación afecta al centro activo de la enzima, produciéndose una alteración estérica en los residuos de dicho centro (Nardi y col., 2006; Seino y col., 2007).

La edad de los organismos parece estar relacionada con la actividad colinesterásica que éstos presentan. Así parece confirmarlo el incremento de la actividad de estas enzimas en aves, desde su nacimiento hasta la aparición de las plumas, y el aumento de entre dos y tres órdenes de magnitud en la actividad durante

las primeras semanas de vida en ratones (Gard y Hooper, 1993; Fishwick y col., 1996). Resultados similares se han observado en los peces. Los peces *Oncorhynchus mykiss*, *Lepomis macrochirus*, *Stizostedion vitreum* y *Oreochromis niloticus* experimentan un descenso de su actividad a medida que los peces van convirtiéndose en adultos (Zinkl y col., 1987; Beauvais y col., 2002; Phillips y col., 2002; Chandrasekara y Pathiratne, 2007). Sin embargo, aunque lo mencionado anteriormente parece confirmar que los organismos jóvenes poseen una mayor actividad de la ChE cerebral que los adultos, existen también animales como las ratas Wistar en que no se observa lo anterior, ya que muestran un incremento de la actividad específica de la AChE cerebral con la edad (Reddy y col., 2007).

Por otro lado, los efectos de la edad sobre la actividad colinesterasa en sangre y en plasma son menos conocidos. La relación inversa entre la actividad de las ChE plasmáticas y la edad parece mantenerse en las aves. Por otro lado, la actividad de las ChE presentes en el plasma de las mujeres varía a lo largo de su vida. Así, esta actividad es más baja durante el periodo comprendido entre los 20 y los 50 años, lo que se relaciona con la menarquía. En cuanto a la actividad de la AChE presente en los glóbulos rojos, ésta aumenta con la edad hasta los 60 años, en ambos sexos (Rattner y Fairbrother, 1991).

La posible influencia del género del organismo en la actividad de las ChE, se ha investigado tanto en animales como en humanos, con resultados dispares. Algunos autores han investigado los posibles efectos del sexo y del periodo reproductivo sobre esta actividad en peces como *Lepomis macrochirus* y *Leuciscus cephalus* sin encontrar ninguna relación entre las variables (Beauvais y col., 2002; Flammarion y col., 2002). En aves y mamíferos tampoco se encuentra una diferencia significativa de la actividad AChE cerebral entre hembras y machos (Rattner y Fairbrother, 1991). Sin embargo, otros autores consideran que el ciclo reproductivo del organismo puede afectar a la cantidad de proteínas que almacena, afectando a la actividad específica de las enzimas colinesterasas (Lau y col., 2004).

En lo referente a la posible influencia del sexo sobre las ChE presentes en plasma y suero se ha sugerido que en aves parece no producirse, aunque existen excepciones. Las hembras de la especie *Falco sparverius* tienen una mayor actividad colinesterasa plasmática que los machos, mientras que otras como *Coturnix japonica* son los machos los que tienen más actividad. Del mismo modo, el hombre al igual que

la cobaya macho presenta una mayor actividad ChE en suero, mientras que en ratas y ratones hembra son éstas las que muestran una mayor actividad. Por su parte, el periodo de reproducción parece que puede afectar a la actividad de estas ChE. Por ejemplo, en el caso de las hembras de *Colinus virginianus* se observa un descenso de la actividad de las ChE plasmáticas del 25% durante la primavera, lo que coincide con el periodo reproductivo y un incremento de la actividad en las hembras reproductoras, cuyos valores más altos se alcanzan durante la incubación (Rattner y Fairbrother, 1991).

Las glándulas endocrinas sintetizan, retienen y liberan directamente a la sangre sus secreciones. Su efecto sobre la actividad colinesterasa ha sido estudiado en ratas de laboratorio; de estos estudios se desprende que la actividad de las ChE no se ve afectada en el caso de la hipofisectomía, aunque se produce un descenso de la actividad con el hipotiroidismo. Por su parte, los estrógenos incrementan la actividad de las ChE en varios tejidos, pero la administración durante 19 días del estrógeno sintético, etilestrenol, produce un descenso de la actividad acetilcolinesterasa del 15% en ratas macho. Por otro lado, dosis farmacológicas de corticosterona no logran alterar la actividad AChE en el cerebro de embriones de pollo, mientras que la administración de acetilcolina y epinefrina incrementa la actividad colinesterasa plasmática en aves como la codorniz; sin embargo, dosis farmacológicas de corticosterona y epinefrina, producen una reducción de la actividad de estas enzimas en las crías de esta ave (Rattner y Fairbrother, 1991).

Los ritmos circadianos afectan a la mayoría de los seres vivos, desde bacterias hasta mamíferos. La sucesión de días y noche produce la oscilación de factores externos, como la luz, la temperatura o la humedad que repercute sobre los organismos; casi todos ellos se ven afectados por un período de 24 horas, con sus horas de luz y de oscuridad. Muchas de las actividades realizadas por los organismos son controladas de alguna manera por estos ritmos, como la puesta de muchos animales, que se realiza a determinadas horas (Margalef, 1991). Por este motivo, se han realizado estudios sobre el efecto de estos ritmos en la ChE cerebral de aves y roedores. La actividad colinesterásica del ave *Colinus virginianus* no mostró ninguna alteración en condiciones normales (16 h diurnas/8 h nocturnas). Por el contrario, se produjo la alteración de ésta en *Zonotrichia leucophrys gambelii*. En el caso de las experiencias realizadas en roedores los resultados son confusos. Unos autores han encontrado diferencias en la actividad de hasta el 50% entre el día y la noche,

mientras que otros han registrado un pico importante a media noche (Rattner y Fairbrother, 1991).

Por su parte, la actividad colinesterasa en el plasma parece verse influida por estos ritmos, encontrándose diferencias de hasta el 22% dependiendo de la hora del día (Rattner y Fairbrother, 1991).

Por otro lado, los ritmos circunuales endógenos controlan entre otras actividades la reproducción o la migración de animales como las aves (Margalef, 1991; Gwinner, 2003). Los trabajos realizados sobre las variaciones estacionales de las ChE en diferentes organismos han revelado que estas enzimas también están sometidas a estos ritmos. Así, se ha puesto de manifiesto en estudios llevados a cabo con *Crangon crangon* en la costa atlántica de la península ibérica, viéndose incrementada la actividad de la AChE durante los meses de verano y otoño (Quintaneiro y col., 2006). Un comportamiento similar tiene la actividad de la AChE del copépodo *Tigriopus brevicornis* y el pez *Pomatoschistus microps* (Forget y col., 2003; Monteiro y col., 2007). Sin embargo, *Mytilus galloprovincialis* presente en el Delta del Ebro, aumenta su actividad acetilcolinesterásica en invierno, descendiendo en verano (Escartín y Porte, 1997). Estas variaciones han sido apreciadas, además, en estudios realizados con *Perna viridis* y *Tapes philippinarum*, los cuales presentan un máximo en invierno y un mínimo en verano (Lau y col., 2004; Matozzo y col., 2005).

Las posibles explicaciones a la variación estacional que estas enzimas experimentan son diversas, entre las que encontramos la temperatura del agua, la variación estacional de los posibles contaminantes que puede afectar a su biodisponibilidad, el periodo reproductivo o el estado de desarrollo de los organismos, el contenido de proteínas de los individuos, etc. (Radenac y col., 1998; Forget y col., 2003; Matozzo y col., 2005; Monteiro y col., 2007). Otro factor que podría afectar a la actividad de la enzima sería el periodo de muestreo, caso del lagarto canario *Gallotia galloti palmae*; la actividad de la BChE presente en su sangre es mayor en los ejemplares recogidos en verano, lo que podría estar relacionado con la influencia de la temperatura ambiental sobre los niveles de dichas enzimas (Sánchez-Hernández y col., 2004).

Además de los factores descritos anteriormente existen otros como la temperatura ambiental, el estado nutricional o el estado físico del individuo que

pueden afectar al organismo, produciéndole un estrés que afecte a la actividad de las ChE.

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes, influyendo en todas las reacciones bioquímicas y causando un gran impacto sobre la fisiología y la bioquímica de los organismos ectotérmicos. Por esta razón, la temperatura ha sido objeto de numerosos trabajos, al poder ser una posible causa de la variación de la actividad colinesterasa (Baer y col., 2002; Pfeifer y col., 2005). En general, las bajas temperaturas reducen las actividades metabólicas y podría provocar un descenso de la actividad de las ChE, y a la inversa, unas temperaturas altas podrían llevar aparejadas un aumento de su actividad. De igual modo, la temperatura puede afectar directamente a la función que desempeña la enzima, ya que puede producir un cambio en su estructura física y en su eficacia catalítica (Hochachka y Somero, 1984) o en su capacidad de unión (Escartín y Porte, 1997). En organismos como el pez *Carassius aurata* se ha constatado que existen diferencias importantes entre los individuos aclimatados a 25°C y aquellos que se expusieron a temperaturas de 5 o 15°C, siendo la actividad colinesterásica mayor en los ejemplares aclimatados a 25°C (Hazel, 1969). Sin embargo, otros trabajos recogen la existencia de una relación inversa entre la temperatura y la actividad de la ChE cerebral del *Cyprinus Carpio* (Verma y col., 2007) e incluso otros estudios no aprecian diferencias significativas en la actividad colinesterasa al someter a distintos peces (*Oncorhynchus mykiss*, *Stizostedion vitreum* y *Lepomis macrochirus*) a diferentes temperaturas (Zinkl y col., 1987; Phillips y col., 2002; Beauvais y col., 2002). En organismos como el *Mytilus* sp. se observa una relación entre la actividad acetilcolinesterasa presente en las branquias y los cambios estacionales de la temperatura del agua, al aumentar ésta también lo hace la actividad enzimática (Pfeifer y col., 2005).

Los efectos de la dieta sobre la actividad basal de las ChE se ha investigado tanto en aves como en mamíferos, observándose que una restricción diaria del 50% durante diez días no afecta a la actividad AChE cerebral en el ave *Colinus virginianus*. Asimismo, la ausencia total de alimentación durante tres días, no afecta la actividad de esta enzima en *Coturnix japonica*. No obstante, si se alimenta a los individuos con la mitad de la ración habitual durante 21 días, se aprecia una reducción de peso de hasta un 30% y una depresión de la actividad AChE cerebral de un 17%. Otras experiencias realizadas en ratas de laboratorio de distintas edades no han arrojado resultados claros (Rattner y Fairbrother, 1991).

En relación a la actividad de las ChE presentes en sangre y plasma no parece verse afectada en pollos domésticos y en *Coturnix japonica*, aunque una prolongada mal nutrición en este último eleva su actividad colinesterasa plasmática. Por otro lado, se ha demostrado que las dietas con bajo contenido en calcio o alto contenido en grasas no afectan a la actividad colinesterasa plasmática en ratas, pero elevan la actividad colinesterásica de los glóbulos rojos (Rattner y Fairbrother, 1991).

El estado del organismo y las posibles enfermedades que pueda presentar puede afectar a la ChE. Por ejemplo, un daño hepático agudo en caninos causa un incremento de la actividad colinesterasa en el plasma, mientras que en el hígado, se produce el descenso de la actividad de dichas enzimas; esto podría deberse al daño producido en los hepatocitos, que llevaría ligada la liberación de estas enzimas en sangre, incrementando sus niveles en ella. De la misma forma, una pérdida de sangre en mamíferos incrementa la actividad AChE de los glóbulos rojos al incrementarse el número de células inmaduras, ya que éstas poseen una mayor actividad AChE. La obesidad en humanos, es otro factor que puede producir el incremento de la actividad colinesterasa en el plasma. Asimismo, se ha observado que los enfermos de Alzheimer poseen una actividad acetilcolinesterásica cerebral más baja que la media, mientras que la actividad de las ChE en el plasma es mayor (Rattner y Fairbrother, 1991).

Además de los insecticidas organofosforados y carbamatos, existen otras sustancias capaces de afectar a estas enzimas, como los metales, los detergentes y algunas cianobacterias (Guilhermino y col., 1998; Rabitto y col., 2005; Monserrat y col., 2001).

Los metales pesados han incrementado su presencia en los diferentes ecosistemas debido a la actividad antropogénica. Muchos de ellos pueden producir importantes daños en ecosistemas y organismos; algunos tienen la capacidad de bioacumularse y/o bioconcentrarse en los tejidos, causando daños tanto en los organismos donde se acumulan como en los depredadores que se alimentan de ellos.

Estos metales son agentes anticolinesterásicos no específicos, relacionados con la inhibición de la actividad de las ChE tanto en peces como en invertebrados (Cajaraville y col., 2000; Costa y col., 2007), si bien es cierto que la concentración de metales necesaria para producir la inhibición de las enzimas es sensiblemente

superior a la de los OF o carbamatos (Payne y col., 1996; Cunha y col., 2007). A pesar del desconocimiento del mecanismo de inhibición de la colinesterasa por los metales, parece aceptarse que la enzima es desactivada por el metal, al unirse al centro aniónico de la enzima e impidiendo la unión de ésta con la acetilcolina. La potencia inhibidora dependería en este caso de las características de cada metal (radio iónico, capacidad de complejación, electronegatividad o potencial reductor) (Guilhermino y col., 1998; Grippo y Heath, 2003).

Los estudios realizados sobre este tema han dado lugar a resultados en ocasiones contradictorios. Así, encontramos trabajos donde el cadmio o el mercurio inhiben la actividad colinesterasa cerebral presente en *Lepisosteus oculatus* (Huang y col., 1997), al igual que el plomo y el uranio en el teleósteo *Brachydanio rerio* (Labrot y col., 1996). Mientras tanto, el propio cadmio no produce estos efectos sobre las enzimas colinesterasas en *Monodonta lineata* a las concentraciones estudiadas, ni *in vivo* ni *in vitro* (Cunha y col., 2007). Sin embargo, otros peces expuestos a este mismo metal sufren la inhibición de la AChE *in vitro*, mientras que *in vivo* se observa un incremento de la actividad (Gill y col., 1991). Esta diferencia entre los resultados *in vivo* e *in vitro* se atribuye a la presencia de metalotioneínas, proteínas sintetizadas principalmente en las branquias, el hígado y los riñones. Estas enzimas se unen al cadmio (II) disminuyendo la toxicidad sobre el organismo (De Conto Cinier y col., 1998).

La presencia de los detergentes en el medio ambiente es una consecuencia de la acción del hombre. Son sustancias persistentes en el medio, consecuencia de su escasa degradación metabólica y su lipofilidad. En lo referente a su acción sobre las ChE, se ha comprobado que el detergente SDS (dodecil sulfato sódico) a una concentración de 6,25 µg/L *in vitro* produce un descenso significativo de la actividad colinesterásica de *Gambusia holbrooki* (Nunes y col., 2005). Los mecanismos que producen la inhibición de estas enzimas por los detergentes no se han establecido con claridad. Una posible causa sería la desnaturalización de la enzima, aunque esto es poco probable al precisarse una alta concentración de detergente. Una explicación más plausible podría ser la capacidad de los detergentes para inducir una alteración de las cargas superficiales de las proteínas, cambiando su configuración en la disolución (Scopes, 1982).

Por otro lado, la actividad de las ChE puede verse afectada por la presencia de fitotoxinas presentes en la columna de agua durante los blooms de fitoplancton (Bocquené y col., 1997b). Asimismo, las cianobacterias producen neurotoxinas que son como OF naturales, de modo que pueden inhibir a las ChE, al igual que la diatomea *Pseudonitzschia multiseries* que produce un aminoácido neurotóxico, el ácido domoico, el cual ocasiona el mismo efecto (Dizer y col., 2001; Monserrat y col., 2007).

Por último, señalar que algunas plantas utilizadas tradicionalmente en la medicina oriental y que en la actualidad están siendo estudiadas para la paliación de enfermedades degenerativas del sistema nervioso, pueden afectar a la actividad de las enzimas ChE (Chattipakorn y col., 2007; Mukherjee y col., 2007).

1. 3. 7. APLICACIONES DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA

El principal uso de las enzimas ChE se basa en la inhibición de éstas ante la presencia de pesticidas OF y carbamatos, característica que ha permitido su utilización como biomarcador (Monserrat y col., 2007). La determinación de estos pesticidas en el medio ambiente es complicada ya que su vida media es relativamente corta. Sin embargo, la medida de la inhibición de las ChE en los organismos puede ser utilizada para evaluar el impacto de estos compuestos sobre la biota, al permanecer estas enzimas inhibidas días e incluso semanas. Por este motivo, la relación entre la presencia de estos compuestos en el medio y la actividad colinesterasa de los tejidos ha sido utilizada como biomarcador tanto en vertebrados como en invertebrados (Galgani y Bocquené, 1990; Mora y col., 1999; Sturm y col., 1999; Fulton y Key, 2001; De la Torre y col., 2002; Tortelli y col., 2006). También, estas enzimas han sido utilizadas como biomarcadores de otras sustancias como los metales y los detergentes (Guilhermino y col., 1998; Elumalai y col., 2002).

Dentro de este grupo de enzimas, la BChE es inhibida por agentes anticolinesterásicos con mayor rapidez que la AChE. Por este motivo, la BChE podría ser utilizada como marcador a la exposición ocupacional por OF (Goodall, 2006). Esta enzima presente en el músculo de algunos peces es más sensible a los OF que la AChE, y aunque varía dependiendo de la especie, en ocasiones puede ser extremadamente sensible a ellos (Sturm y col., 1999). Esto ha hecho pensar que la medida de la BChE podría ser utilizada en este ámbito como biomarcador.

Asimismo, en la actualidad existe un gran interés en utilizar las B-esterasas presentes en suero y plasma como índices de exposición a los OF, constituyendo un método alternativo para la detección de intoxicaciones producidas por éstos que no lleve asociado la muerte del organismo afectado (Sanchez y col, 1997; Walker y col., 1998). Por ello, se ha intentado establecer una relación entre las enzimas presentes en suero y en cerebro con el objeto de evaluar la inhibición de la AChE cerebral (biomarcador de efecto) mediante la medida de la actividad ChE o CaE presente en el suero (biomarcadores de exposición). Sin embargo, el hecho de que la BChE y la CaE no parezcan tener relación con los mecanismos tóxicos de los OF hace pensar que la relación entre éstas y la AChE cerebral puede ser casual (Sánchez-Hernández y Walker, 2000). Además, la rápida recuperación de la actividad de la BChE presente en la sangre tras la exposición a los OF y carbamatos, unido a su alta variabilidad entre individuos de la misma especie, hace que se cuestione su uso como biomarcador en los programas de monitorización (Walker, 1995). De igual manera, la utilización de la AChE como biomarcador no está exenta de controversia. La existencia de colinesterasas polimórficas con diferentes sensibilidades a los agentes anticolinesterásicos, requiere una previa caracterización bioquímica de las formas presentes en las especies utilizadas como bioindicadores y un conocimiento previo del rango de actividad que se considera como normal en aquellos individuos no expuestos a los OF (García y col., 2000).

Los biosensores son otra posible aplicación de las enzimas colinesterasas. Un biosensor es un dispositivo que transforma una información química en una señal analítica útil. El biosensor incorpora un elemento de reconocimiento biológico o biomimético asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el elemento a reconocer. Los compuestos organofosforados se han medido tradicionalmente mediante cromatografía de gases, cromatografía líquida o técnicas espectroscópicas. Estas técnicas necesitan unos técnicos cualificados, consumen mucho tiempo y no permiten realizar una monitorización continua (Jaffrezic-Renault, 2001). Así, los biosensores basados en las ChE han emergido como una técnica altamente sensible y selectiva para la monitorización toxicológica del medio ambiente, la agricultura, la alimentación y las aplicaciones militares. Es en la determinación de pesticidas donde estos biosensores tienen su principal aplicación, al medir la presencia de éstos *'in situ'*, sin un elevado coste y de forma más sencilla. La cuantificación del pesticida anticolinesterásico se basa en la medida del descenso de la actividad colinesterásica

tras la exposición a los compuestos tóxicos. La medida proporciona información de la toxicidad anticolinesterásica total, pero no detecta ni cuantifica selectivamente los distintos pesticidas. Se han desarrollado también amperímetros, potenciómetros y conductímetros basados en este principio (Andreescu y Marty, 2006). La existencia de otras sustancias capaces de producir la inhibición de estas enzimas hace que los biosensores puedan ser aplicados para la determinación de anatoxinas (OF naturales producidos por bacterias), gases nerviosos (sarín, soman, etc.) y metales pesados (Vilatte y col., 2002; Sadik y col., 2004). En todos estos casos, el objetivo fundamental es obtener un método de determinación simple, portátil y fiable, que permita detectar bajas concentraciones de los contaminantes en tiempo real.

Por otro lado, se ha investigado el posible uso terapéutico de las enzimas ChE. En estos ensayos se ha comprobado que el tratamiento previo de primates con AChE procedente del suero bovino fetal ejerce una protección efectiva contra los efectos nocivos del soman (Maxwell y col., 1992). Del mismo modo, se ha demostrado que el tratamiento previo ChE plasmática humana con ratones, los protege de los efectos letales de la cocaína (Hoffman y col., 1996). Otra posibilidad que se está desarrollando en la actualidad es la manipulación genética de la BChE para conseguir una enzima resistente a los OF. Esta butirilcolinesterasa mutagénica podría hidrolizarlos, pudiendo ser utilizada como antídoto frente a las intoxicaciones por OF (Sultatos, 2006).

1. 4. LA DORADA (*Sparus aurata*)

1. 4. 1. DESCRIPCIÓN

La dorada, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), es un teleósteo perciforme perteneciente a la familia *Sparidae* y orden Perciformes. Esta especie posee un cuerpo oval comprimido lateralmente, característico de la familia a la que pertenece. Su cabeza es especialmente robusta y con un perfil algo convexo. La boca es pequeña, cuenta con mandíbulas poco extensibles y con labios gruesos. En la parte inferior de la boca se encuentran de 4 a 6 dientes caninos, mientras que en su parte posterior se sitúan los potentes dientes molares (Bad, 2004). Esta boca les permite romper el caparazón de conchas y crustáceos base de su alimentación (Coll, 1991; Mojette y Ghisotti, 1994).

El dorso de la dorada es gris plateado, su vientre presenta una tonalidad blanquecina y sus flancos muestran ligeros reflejos amarillos. Su característica más distintiva y por la que recibe el nombre de dorada, es la mancha dorada que posee entre sus pequeños ojos. Además se puede observar otra mancha negra en el origen de la línea lateral, extendiéndose sobre el margen superior del opérculo. A menudo presenta líneas longitudinales oscuras sobre los costados del cuerpo, además de una banda también oscura sobre la aleta dorsal (FAO, 2007).



Figura 1.6. *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

1. 4. 2. HABITAT Y BIOLOGÍA

La dorada es una especie muy común en el mar Mediterráneo, aunque puede hallarse a lo largo de la costa oriental Atlántica desde Gran Bretaña a Senegal, y más raramente en el mar Negro. Debido a su naturaleza eurihalina (5 a 44 g/L de salinidad) y euritérmica (5-32°C), esta especie habita zonas litorales en ambiente marinos, lagunas costeras y esteros (Suau y López, 1976; Bauchot y Hureau, 1986). La dorada, dependiendo de la etapa vital en la que se encuentre, puede realizar migraciones desde las zonas costeras hasta mar abierto, y viceversa (Arias, 1978). Nace en mar abierto durante octubre-diciembre, pero debido a que esta especie es sensible a las bajas temperaturas, se produce la migración de los juveniles a principios de la primavera hacia las zonas de la costa, donde encuentran abundantes recursos tróficos y temperaturas más suaves. Es al final del otoño, cuando retornan a mar abierto, donde se reproducen los peces adultos. Durante su estancia en el mar abierto, es

frecuente encontrarlas sobre fondos rocosos y praderas de fanerógamas como la *Posidonia oceanica*, al igual que sobre fondos arenosos (Moretti y col., 1999). Esta especie es hermafrodita proterándrica. La dorada joven es un macho funcional que alcanza la madurez sexual a los 2 años (20–30 cm), y tras un periodo de 2 o 3 años se transforma en una hembra (33–40 cm) (Barnabé, 1991). Esta transformación va a estar determinada por factores sociales (Zohar y col., 1995). Las hembras pueden poner entre 20 000–80 000 huevos cada día (de un diámetro de 0.8-1mm) por un período de hasta 4 meses. Los huevos fecundados son esféricos, transparentes y con una única gota lipídica. La segmentación comienza una hora después de la fecundación, cuando se observa la primera división celular que da lugar a dos blastómeros idénticos. Las sucesivas divisiones ocurren aproximadamente cada hora. A las 15-18 horas de la fecundación, el blastodisco forma una hemisfera alrededor del vitelo iniciándose así el proceso de gastrulación. Tras 23 horas después de la fertilización comienza la formación del esbozo embrionario y hacia las 38 horas, se observan los primeros latidos del corazón y el embrión empieza a moverse dentro del huevo. La eclosión comienza aproximadamente 48 horas tras el desove a 16-17 °C. La larva recién eclosionada mide escasamente 1 mm (Villani, 1976) y la reabsorción del saco vitelino se produce tras 3-4 días de alimentación endógena (Koven, 2002). La larva permanece pelágica durante dos meses tras los cuales se produce la metamorfosis. En la Figura 1.7 se resume su ciclo vital.

En cuanto a su alimentación, parece ser una especie oportunista, capaz de adaptarse a la comida disponible en su habitat. En general, su dieta se basa principalmente en moluscos (bivalvos y gasterópodos) y crustáceos, además de poliquetos, algas y ocasionalmente peces e insectos (Arias, 1980; Ferrari y Chierogato, 1981; Pita y col., 2002). Su crecimiento varía en función de su localización, creciendo más rápido en zonas semicerradas y salobres, como esteros y lagunas (Arias, 1980; Castelló-Orvay y Calderer, 1993), que en zonas abiertas. En cualquier caso, la dorada es una especie de crecimiento rápido en la naturaleza, que consigue los 300 g en el segundo año y los 600 g en el tercero, pudiendo alcanzar un tamaño de 70 cm y un peso de 5 kg. Se captura principalmente en otoño cuando migra de las lagunas costeras hacia el mar.

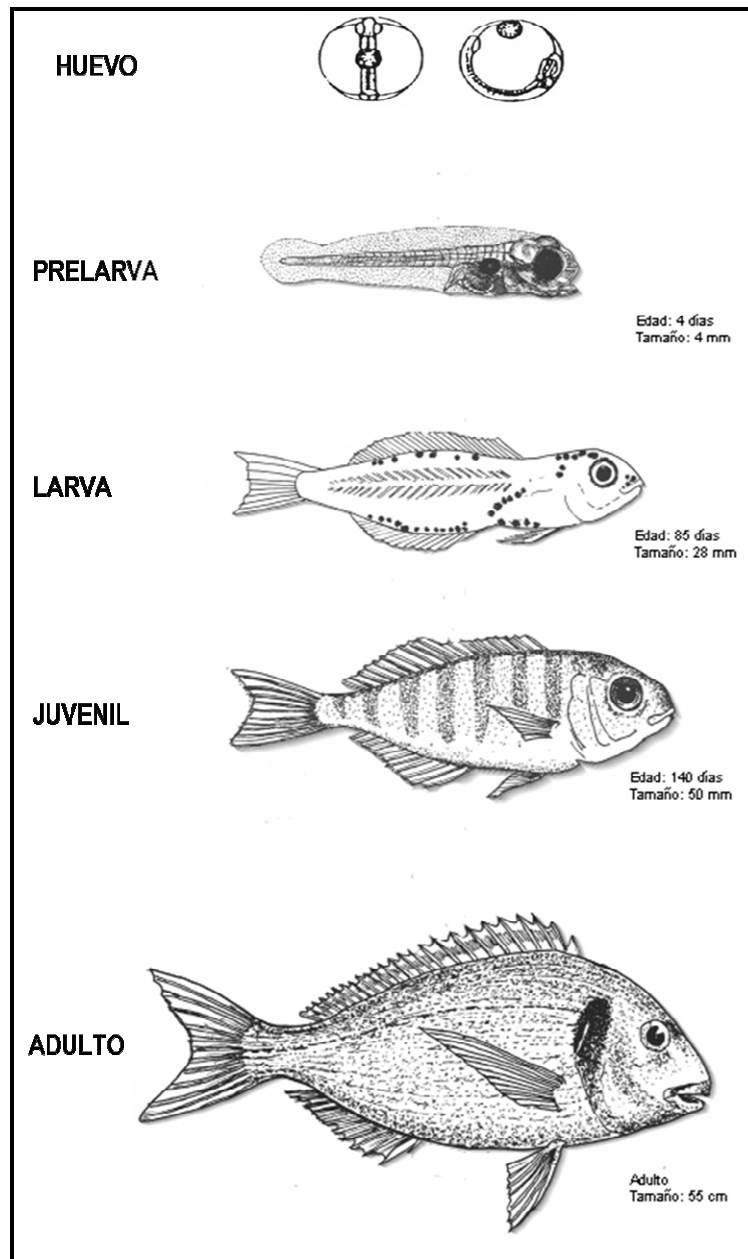


Figura 1.7. Resumen del ciclo vital de la dorada

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral consiste en el estudio de la validez de esta especie como bioindicador de la contaminación del medio marino por compuestos anticolinesterásicos como los plaguicidas organofosforados.

Para alcanzar el objetivo principal los objetivos específicos que se han planteado son los siguientes:

1. Caracterizar las colinesterasas en la dorada en términos de su distribución en cerebro, músculo y plasma, especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores específicos.
2. Investigar la variabilidad natural en la actividad colinesterasa basal en la dorada y estudiar su relación con la edad y con parámetros morfométricos.
3. Investigar la sensibilidad *in vitro* de las colinesterasas de la dorada a plaguicidas organofosforados de diferente estructura (azinfosmetil, dimetoato, diclorvos y paratión) y estudiar las características del tipo de inhibición enzimática realizada por parte de dichos compuestos.
4. Estudiar y comparar el curso temporal de los efectos anticolinesterásicos de los compuestos organofosforados objeto de estudio mediante estudios *in vivo* con el fin de conocer el perfil de recuperación de las colinesterasas presentes en los distintos tejidos tras la exposición a una dosis subletal.
5. Evaluar el tejido más adecuado para las medidas enzimáticas en el supuesto de que esta especie se pretenda utilizar en programas de biomonitorización.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. REACTIVOS

- Azinfosmetil (O,O-dimetil S-[4-oxon-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il]metil]fosfoditioato), (Chem Services, West Chester, PA, USA).
- Diclorvos (2,2-diclorovinil dimetil fosfato), (Sigma Chemical Co.)
- Dimetoato (O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato), (Sigma Chemical Co).
- Paratión (O,O-dietil O-4-nitrofenil fosforoditioato), (Chem Services, West Chester, PA, USA).
- Azinfosmetil-oxón, (Chem Services, West Chester, PA, USA).
- Ometoato, (Chem Services, West Chester, PA, USA).
- Paraoxón, (Sigma Chemical Co.)
- Yoduro de acetiltiocolina (AcSCh), (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Yoduro de butirilcolina (BuSCh), (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Yoduro de acetil-beta-metiltiocolina (Ac β SCh), (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Yoduro de propioniltiocolina (PrSCh), (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzónico) (DTNB), (Merck).
- 1,5-bis(4-alildimetilamoniofenil)-penta-3-ona dibromuro (BW284c51), (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Tetraisopropilo pirofosforamida (isoOMPA), (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Sulfato de eserina, (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Bio-Rad Protein Assay (Dye Reagent concentrate) (Bio-Rad)
- Albúmina Sérica Bovina (BSA), (Bio-Rad).
- Metanol 'grado analítico', (Scharlau).
- Di-sodio hidrogenofosfato anhidro (Merck).
- Sodio dihidrogenofosfato monohidrato (Merck).
- Hidróxido sódico (Scharlau).
- Tris-(hidroximetil) aminometano (Tris) (Scharlau, Chemie S.A Barcelona, España).
- Suero Fisiológico (NaCl al 0,9%) (Fresenius Kabi, Barcelona, España).
- Aceite de Maíz (Asúa).

3. 2. MATERIAL BIOLÓGICO

Los ejemplares de dorada, *Sparus aurata*, utilizados en este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de Cultivos Marinos de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz, con número de registro CA/3/U en la Sección de Establecimiento Usuario y CA/4/CS en la Sección de Establecimiento de Cría y Suministro de Animales de Experimentación del Registro de Establecimientos de Cría, Suministradores y Usuarios de Animales de Experimentación de la Comunidad Autónoma de Andalucía.

Los protocolos experimentales empleados en este trabajo se ajustan a la legislación existente sobre experimentación animal (Directiva 86/609/CEE y RD 223/1988) y obtuvieron informe favorable del Comité de Ética para la Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Cádiz que fue emitido para la realización del Proyecto de Investigación en el que se inscribe la tesis doctoral.

Los peces fueron conservados todo el tiempo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivos Marinos en un circuito abierto de agua de mar con una salinidad del 38,9, bajo condiciones de fotoperiodo natural y una temperatura comprendida entre los 18 y los 19 °C.

3. 3. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Los peces se anestesiaron por inmersión en metanosulfonato de triclaína o MS-222 (0,1 g/L agua de mar) y se procedió a la medida de su peso y tamaño (Figuras 3.1 y 3.2). A continuación se realizó una extracción de sangre de la vena caudal (Figura 3.3) que se recogió en tubos Eppendorf heparinizados. Posteriormente, los animales fueron decapitados y se procedió a la extracción del cerebro (Figura 3.4) y de una porción del músculo esquelético de la parte dorsal (Figura 3.5).

La sangre obtenida de los distintos individuos fue centrifugada inmediatamente tras su extracción en una centrífuga refrigerada Heraeus Megafuge 1.0R a 4°C durante 5 min a 2500 rpm (560 x g). El plasma fue recogido en tubos Eppendorf y almacenado a -80°C hasta su análisis.

La preparación de los tejidos se llevó a cabo mediante la homogeneización en hielo con un homogenizador de alta velocidad Ultra-Turrax (Schott Ibérica, España) a razón de 20 mg de tejido cerebral o muscular por cada mililitro de tampón fosfato 0.1M de pH 7.4 (frío). El homogeneizado fue centrifugado a 10.000 rpm (9000 x g) durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El pellet obtenido se descartó y el sobrenadante, consistente en la fracción submitocondrial (S9), se guardó en alícuotas, en cápsulas Eppendorf, y se preservó a -80°C hasta su posterior análisis.



Figura 3.1. Tallaje de *Sparus aurata* con el ictiómetro.



Figura 3.2. Pesaje de la dorada.



Figura 3.3. Extracción de sangre a través de la vena caudal.



Figura 3.4. Extracción del cerebro de *Sparus aurata*.



Figura 3.5. Porción de músculo dorsal utilizado para la determinación de la actividad ChE.

3. 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

3. 4. 1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA

La actividad colinesterasa presente en el plasma, cerebro y músculo esquelético de la dorada se determinó a 25°C mediante el método de Ellman (1961), modificado para microplacas según Guilhermino y col., (1996). En un ensayo típico, esta actividad fue medida añadiendo en cada pocillo 0,05 mL de plasma u homogeneizado tisular y 0,25 mL de una mezcla que contenía el sustrato y el reactivo de Ellman (DTNB), que llamaremos mezcla de reacción. En los ensayos definitivos, dicha mezcla se preparó añadiendo 30 mL de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), 1 mL de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 10 mM, preparado en dicho tampón, y 0,2 mL de acetiltiocolina (ASCh) 200 mM disuelta en agua ultrapura calidad MilliQ. Las concentraciones finales en los pocillos fueron: ASCh 1,07 mM y DTNB 0,27 mM. Tal como se describe más adelante, en ciertos ensayos se varió el pH del tampón, el tipo de sustrato o la concentración de sustrato, siguiendo una metodología similar. Además de acetiltiocolina, se utilizaron como sustratos: acetil-beta-metiltiocolina (A β MSCh), butiriltiocolina (BSCh) y propioniltiocolina (PSCh). En todos los ensayos preliminares realizados durante el estudio se utilizó una concentración final de sustrato de 0,40 mM, partiendo de una disolución 75 mM para preparar la mezcla de reacción.

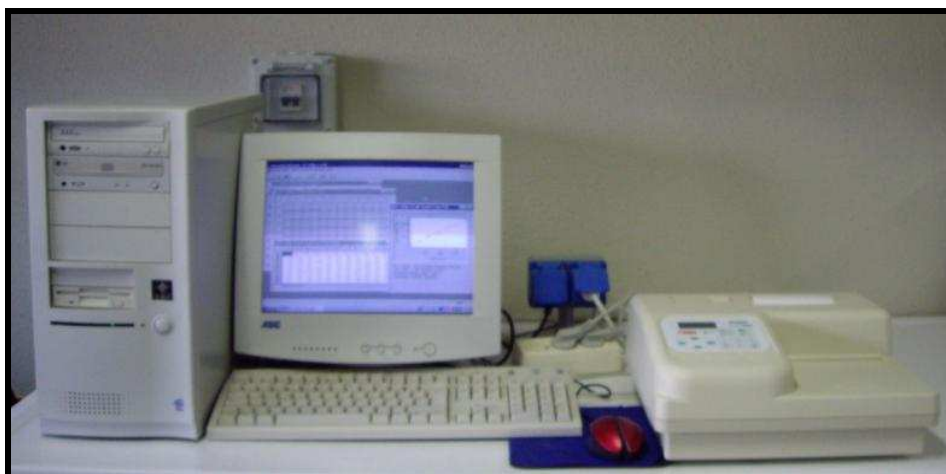


Figura 3.6. Lector de microplacas utilizado para la determinación de proteínas y actividad colinesterasa.

Tras mezclar el contenido de cada pocillo, la velocidad de reacción enzimática se cuantificó mediante un lector de microplacas Bio-Rad, modelo 680 (Figura 3.6), midiendo la absorbancia a 415 nm cada 30 segundos durante 3 minutos, debida al anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) formado según la reacción descrita por Ellman y colaboradores (1961) que se detalla en la Figura 3.7:

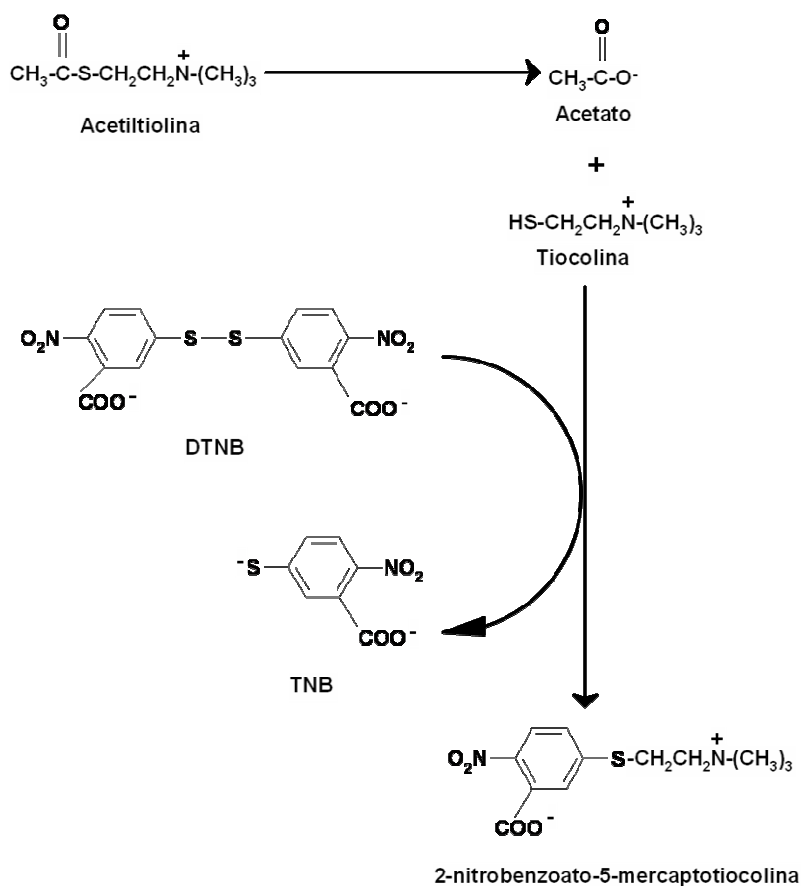


Figura 3.7. Reacción descrita por Ellman y col. (1961).

En cada experimento se midió un blanco sin muestra para estimar la velocidad de hidrólisis espontánea del sustrato y un segundo blanco sin sustrato para evaluar la reacción de los tioles con el DTNB. En el primer caso, en el pocillo de la microplaca se sustituyó la muestra por tampón fosfato, mientras que en el segundo, la mezcla de reacción usada para adicionar al pocillo fue preparada sin el correspondiente sustrato.

En el caso del tejido muscular ambos valores fueron sustraídos de las medidas obtenidas para cada muestra; el valor resultante fue usado para calcular la actividad enzimática. Para las muestras de cerebro, se restó solo la parte de hidrólisis espontánea, ya que la reacción debido a los compuestos que contienen tiol era insignificante.

Cada muestra se determinó por triplicado. La actividad enzimática en la fracción submitocondrial (S9) procedente de cerebro y músculo, así como la presente en el plasma, se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto por miligramo de proteína ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). La actividad enzimática fue calculada según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática } (\text{nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}) = \left(\frac{V}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta DO / \text{min} \right)$$

siendo V el volumen total de la mezcla en el pocillo (mL), v el volumen del extracto S9 o plasma (mL), d el paso de luz en la microplaca $\Delta DO/\text{min}$ el incremento de densidad óptica por minuto y ϵ el coeficiente de extinción molar del TNB ($13600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La actividad específica se determinó a partir del cociente:

$$\text{Actividad específica } (\text{nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}) = \frac{\text{Actividad } (\text{nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1})}{\text{concentración de proteínas } (\text{mg mL}^{-1})}$$

El paso de luz en la microplaca, que depende del volumen de líquido, se calculó a partir del cociente entre el resultado obtenido con el método de microplacas y el valor obtenido en un espectrofotómetro con una cubeta de 1 cm. En las condiciones del ensayo su valor fue de 0,874 cm.

3. 4. 2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976) adaptado a microplacas (ensayo estándar BioRad), usando Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar. El método se basa en la unión de un colorante, el Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas. La disolución del colorante libre, en disolución ácida, es de color rojizo (máxima absorción a 465 nm) y cambia al azul (máxima absorción a 595 nm) cuando se une a las proteínas. La unión es un proceso rápido (aproximadamente 2 minutos) y el complejo colorante-proteína se mantiene estable hasta una hora después de producido.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, añadiendo 0,01 mL de muestra o patrón de proteínas (0, 0,0625, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/mL de BSA) y 0,2 mL de reactivo de Bradford, preparado mezclando una parte del reactivo comercial concentrado con cuatro partes de agua milli-Q. Las muestras se dejaron reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Cada muestra se determinó por triplicado.

3. 5. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS

La caracterización de las enzimas colinesterasas presentes en el cerebro y en el músculo de la dorada se llevó a cabo determinando su preferencia por distintos sustratos y su respuesta ante distintos inhibidores específicos.

3. 5. 1. ESTUDIOS PRELIMINARES

Previamente al estudio definitivo de caracterización, se realizó un ensayo preliminar de la actividad enzimática en los distintos tejidos (cerebro, músculo y plasma) frente a una única concentración (concentración final 0,40 mM) de los siguientes sustratos: ASCh, A β MSCh, BSCh y PSCh, utilizando para la preparación de la mezcla de reacción tampones de diferentes pH (5,7; 6,7; 7,4; 8,0; 8,6 y 9,2). Estas experiencias permitieron elegir el pH óptimo, que fue utilizado a partir de ese momento, a lo largo de todo el estudio, para la determinación de la actividad enzimática.

Una vez elegido el pH óptimo, se realizó una primera aproximación sobre la afinidad de las ChE presentes en cada muestra por los distintos sustratos, utilizando para ello una concentración de sustrato idéntica a la anterior.

3. 5. 2. SUSTRATOS ESPECÍFICOS Y PARÁMETROS CINÉTICOS

El estudio de la especificidad de las ChE de cerebro y músculo por distintos sustratos se completó midiendo la actividad enzimática frente a concentraciones crecientes de sustrato (ASCh y BSCh) que estaban comprendidas entre 0,03 y 4,27 mM (concentraciones finales). A partir de estos experimentos, se estimaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

Para estos ensayos, en los que se requería una cantidad importante de muestra, se utilizó una mezcla ("pool") de varios cerebros y otra de varios músculos dorsales (10 ejemplares de peso medio $380,7 \pm 42,9$ g y longitud media $29,0 \pm 1,7$ cm), preparadas a partir de 10 mL del homogeneizado de cada ejemplar, los cuales se fraccionaron en pequeñas alícuotas y se congelaron a -80°C hasta su posterior uso. Los resultados de actividad enzimática se expresan como media de 3 determinaciones realizadas con dicho "pool".

En las muestras de plasma no se llevó a cabo el estudio de caracterización debido a que durante el estudio preliminar se detectó una actividad colinesterasa muy baja frente a todos los sustratos estudiados.

La constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima de hidrólisis del sustrato (V_{\max}) se determinaron a partir de una representación de los dobles inversos (gráfico Lineweaver-Burk) mediante el programa Kinetics Pro version 2.36.

3. 5. 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS USANDO INHIBIDORES ESPECÍFICOS

Los inhibidores específicos utilizados para estos ensayos fueron: sulfato de eserina, iso-OMPA y BW284c51. La eserina se usó como inhibidor selectivo de la actividad de todas las ChE presentes en el tejido, el iso-OMPA como inhibidor de la butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa y el BW286c51 como inhibidor selectivo de la acetilcolinesterasa.

En estos ensayos se incubaron 45 μL de homogeneizado con 5 μL de la disolución de inhibidor (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} M). Transcurridos 30 min, se determinó la actividad enzimática tal como se describió anteriormente, añadiendo para ello 250 μL de la mezcla de reacción (concentración final de sustrato, 1,07 mM). Los controles fueron incubados con 5 μL de agua milli-Q. Adicionalmente, cuando fue necesario, se prepararon controles con metanol. En todos los casos las medidas se realizaron por triplicado.

3. 6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BASAL Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

El objetivo de estos experimentos fue estudiar la asociación entre la actividad enzimática (AChE cerebral, AChE y BChE muscular) y las siguientes variables: edad (*E*), longitud (*L*), peso corporal (*P*), peso cerebro (*P_c*), peso hígado (*P_h*), índice somático cerebral (*ISC*), índice hepatosomático (*ISH*) y factor de condición (*FC*). Para la realización del estudio se utilizaron 60 individuos de diferentes edades (48, 60, 72, 84, 96 y 152 semanas). El procedimiento de obtención de los extractos crudos de cerebro y músculo y su posterior análisis se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente. La actividad AChE en cerebro se midió directamente usando ASCh como sustrato. Sin embargo, para medir la actividad ASCh en músculo se procedió a la inhibición de la BChE con 10^{-5} M del inhibidor específico iso-OMPA durante 30'. La actividad BChE muscular se midió directamente con BSCh como sustrato.

El factor de condición se determinó a partir de los datos de longitud y peso corporal de cada animal usando la ecuación de Fulton:

$$FC = \frac{P}{L^{-3}} \times 100$$

Donde *P*=peso corporal (g), y *L*= longitud total (cm).

Los índices somáticos de hígado (*ISH*) y cerebro (*ISC*) fueron calculados mediante la fórmula:

$$ISH = \frac{P_h}{P} \times 100 \quad \quad \quad ISC = \frac{P_c}{P} \times 100$$

Donde *P_h*= peso hígado, *P_c*= peso cerebro y *P*= peso corporal.

Análisis Estadístico

A fin de investigar la relación existente entre las variables, se realizó un análisis de correlación (coeficiente de Pearson) y un análisis regresión lineal sobre datos originales y transformados a logaritmo natural de cada variable, tomándose un nivel de significación estadística del 95% ($p < 0,05$). Para cada ecuación de regresión se calcularon los coeficientes de determinación (R^2). Las ecuaciones potenciales ($y = ax^b$) fueron obtenidas a partir de la regresión lineal (método de mínimos cuadrados) de la representación log-log de los valores originales: $\ln y = \ln a + b \ln x$. El exponente *b*

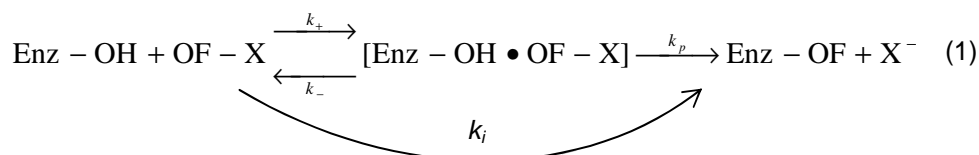
es la pendiente de la representación log-log, y a se obtiene del antilogaritmo del intercepto con y . La normalidad de los datos experimentales (originales y transformados) se evaluó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para el tratamiento de los datos se utilizó el programa SigmaPlot 10.0.

3. 7. ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

3. 7. 1. ENSAYOS *in vitro*

3. 7. 1. 1. Consideraciones teóricas

La reacción simplificada que describe el mecanismo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los OF es la siguiente (Kitz y Wilson, 1962):



En este esquema, X representa el grupo saliente en el OF y k_+ , k_- , k_p y k_i son las constantes de velocidad de afinidad o asociación, disociación, fosforilación e inhibición bimolecular, respectivamente. La constante k_p gobierna la velocidad de formación de la enzima inhibida y depende del enlace covalente en el lugar activo de la enzima, y k_i es la constante de velocidad de la reacción global y se usa a menudo como una medida de la potencia de un inhibidor particular. Esto es, a mayor k_i , más potente es el inhibidor.

La constante de disociación, K_d , que representa la velocidad de formación del complejo reversible enzima-inhibidor $[\text{Enz} - \text{OH} \bullet \text{OF} - \text{X}]$ está definida por:

$$K_d = \frac{k_-}{k_+} \quad (2)$$

La relación entre las constantes de velocidad es (Main, 1964):

$$k_i = \frac{k_p k_+}{k_-} = \frac{k_p}{K_d} \quad (3)$$

Si la concentración más baja del OF es mucho mayor que la de la enzima, la reacción 1 sigue una cinética de primer orden en un amplio rango de concentraciones de inhibidor. Para la reacción 1, se cumple (Kitz y Wilson, 1962):

$$\ln \frac{[E_r]}{[E_0]} = -\frac{k_p t}{1 + K_d/[I]} \quad (4)$$

En la ecuación 4, $[E_0]$ es la actividad tras preincubación en ausencia de inhibidor, $[E_r]$ es la actividad residual tras preincubación con el inhibidor durante un cierto tiempo, t , e $[I]$ es la concentración de inhibidor (organofosforado). De acuerdo con Main (1964), puede calcularse una constante aparente de velocidad de fosforilación, k_{ap} , para distintas concentraciones de inhibidor descomponiendo la ecuación (4) en dos:

$$k_{ap} = -\ln \frac{[E_r]}{[E_0]} / t \quad (5)$$

$$k_{ap} = \frac{k_p}{1 + K_d/[I]} \quad (6)$$

La ecuación 5 indica que k_{ap} puede ser obtenida por regresión lineal representando la actividad residual expresada como $\ln[E_r]/E_0$ frente al tiempo de incubación para cada concentración de inhibidor ($[I]$) (Figura 3.8.A). La ecuación 6 puede convertirse a la siguiente forma lineal:

$$\frac{1}{k_{ap}} = \frac{1}{k_p} + \frac{1}{k_i} \times \frac{1}{[I]} \quad (7)$$

Las constantes de disociación (K_d), fosforilación (k_p) e inhibición bimolecular (k_i) pueden obtenerse gráficamente utilizando la representación doble recíproca de $1/k_{ap}$ frente a $1/[I]$, a partir de los puntos de intersección de la recta resultante con el eje de abscisas (x-intersecto), con el eje de ordenadas (y-intersecto) y de la pendiente de la recta de regresión, respectivamente (Figura 3.8.B).

Como indicador de la sensibilidad de la enzima al inhibidor, puede estimarse también la concentración de inhibidor que produce una inhibición del 50% de la

actividad enzimática (CI_{50}) en 30 minutos, usando la siguiente ecuación (Johnson y Wallace, 1987):

$$CI_{50} = -\frac{\ln 0.5}{k_i \times 30} \quad (8)$$

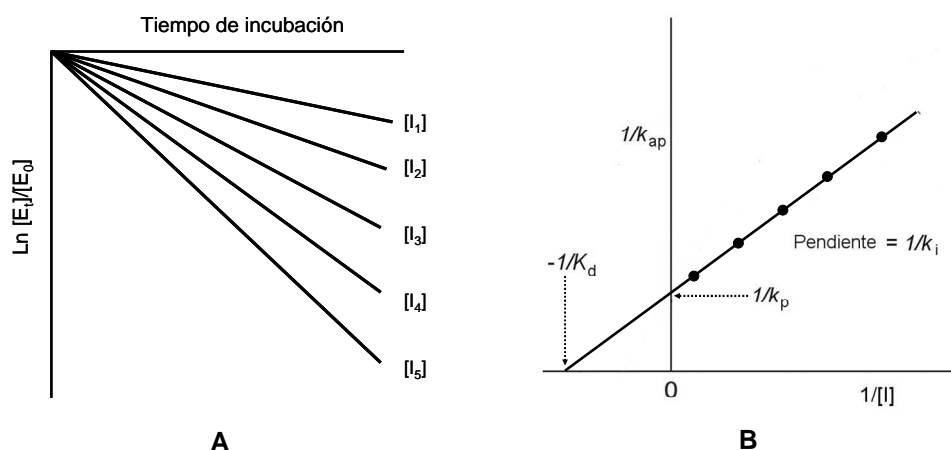


Figura 3.8. Cálculo de las constantes cinéticas. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de inhibidor. Las pendientes, en valor absoluto, de estas rectas corresponden a los valores de las constantes aparentes de velocidad de fosforilación (k_{ap}). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente frente a la concentración de inhibidor. En la recta de ajuste: pendiente = $1/K_i$, y-intercepto = $1/k_p$, x-intercepto = $-1/K_d$.

3. 7. 1. 2. Procedimiento experimental

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con los compuestos organofosforados paraoxón, azinfosmetil-oxón y ometoato, que son los correspondientes oxones activos de los insecticidas de tipo fosforotioato (paratión) y fosforoditioato (azinfosmetil y dimetoato), así como con el organofosforado diclorvos, de tipo fosfato. Para estos estudios se utilizaron alícuotas de los “pool” de cerebro y músculo descritos previamente y se hicieron tres experimentos para cada inhibidor. La actividad colinesterasa se midió tal como se describe en el apartado 3.4.

Para la obtención de las constantes cinéticas se siguió el procedimiento general descrito por Carr y Chambers (1996), modificado. En el pocillo de una microplaca, la fracción S9 obtenida de cada tejido (45 μ L) fue preincubada con el

disolvente (blanco o control) o cinco concentraciones distintas de cada inhibidor (5 μL) durante seis periodos de tiempo comprendidos entre 0 y 5 minutos. Estas proporciones relativas fueron similares a las utilizadas por Kemp y Wallace (1990) y Filho et al. (2004). La reacción de inhibición fue parada después de cada periodo añadiendo 250 μL de la mezcla de reacción que contenía sustrato (acetiltiocolina o butiriltiocolina) y DTNB, y se midió la absorbancia a 415 nm durante 3 min para determinar la actividad ChE, tal como se describió anteriormente. Para tiempo 0, el inhibidor fue añadido simultáneamente con la mezcla sustrato/DTNB. Para cada concentración de inhibidor y el control, se obtuvo la actividad de cada período de preincubación. Para cada tiempo de preincubación, se calculó la fracción de ChE residual ($[E]_t/[E]_0$) dividiendo la actividad residual ChE tras inhibición ($[E]_t$) por la actividad basal no inhibida ($[E]_0$). Todos los insecticidas fueron disueltos en metanol, excepto el ometoato, que se disolvió en agua MilliQ. Estos disolventes se utilizaron para medir los correspondientes blancos.

El procedimiento fue repetido con cinco concentraciones diferentes de cada compuesto (Tabla 3.1), adecuadas para producir entre un 10 y un 90% de inhibición. Tal como apuntan Filho y col. (2004), referenciando los trabajos de Kitz y Wilson (1962) y Main (1964), éstas son las condiciones óptimas para el cálculo de k_{ap} . La linealidad de las regresiones para determinar k_{ap} asegura que las constantes calculadas no dependen de la cantidad de insecticida (Kardos y Sultatos, 2000). Por lo tanto, solo se aceptaron regresiones lineales de $\ln([E]_t/[E]_0)$ frente al tiempo cuando R^2 fue mayor de 0,90. Las regresiones lineales de los dobles recíprocos (gráficos secundarios) fueron considerados solo cuando R^2 fue mayor de 0,90. El cálculo de las constantes cinéticas se llevó a cabo con la hoja de cálculo Excel 2003.

Para la elección de las concentraciones fue preciso realizar diversos ensayos previos enfocados a la determinación del rango de concentraciones satisfactorio a utilizar en los ensayos *in vitro*, de manera que se cumplieran los requisitos mencionados con anterioridad.

Tabla 3.1. Concentraciones de los compuestos organofosforados en el medio de incubación (ensayos *in vitro*).

Colinesterasa	Azinfosmetil-oxón μM	Diclorvos μM	Ometoato μM	Paraoxón μM
AChE cerebral	0,08	29,4	89,8	15,6
	0,12	35,3	134,7	23,4
	0,18	42,4	202,2	35,0
	0,27	50,8	303,2	52,6
	0,41	61,1	454,8	78,9
AChE muscular	0,08	35,4	89,8	10,4
	0,12	42,4	134,7	15,6
	0,18	50,9	202,2	23,4
	0,27	61,1	303,2	35,0
	0,41	73,3	454,8	52,6
BChE muscular	0,08	0,0030	1,35	0,0010
	0,12	0,0035	2,02	0,0016
	0,18	0,0042	3,03	0,0023
	0,27	0,0051	4,55	0,0035
	0,41	0,0061	6,82	0,0053

3. 7. 2. ESTUDIOS *in vivo*

3. 7. 2. 1. Ensayos preliminares dosis-respuesta

Los ejemplares utilizados en los experimentos, de pesos comprendidos entre 300 y 600 g (403 ± 125) se mantuvieron en ayunas, desde 24 horas antes de realizar el tratamiento, en las instalaciones del laboratorio de Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz. Cada grupo experimental ($n=3$) recibió por vía intraperitoneal (i.p.) (Figura 3.9) tres dosis subletales de cada uno de los insecticidas bajo estudio (Tabla 3.2). Debido a su baja solubilidad, los insecticidas azinfosmetil, diclorvos y paratión se administraron utilizando aceite de maíz como vehículo, mientras que el dimetoato se disolvió en suero fisiológico (disolución de NaCl al 0,9%). Como grupos control se utilizaron dos grupos de peces ($n=3$) que fueron tratados con una cantidad equivalente (0,5 mL/500 gr) de aceite de maíz o de solución salina, respectivamente. Previamente a la inyección i.p., los animales habían sido anestesiados por inmersión en metanosulfonato de tricaína o MS-222 (0,1g/L agua de mar).

Trascurridas 24 h de permanencia en agua de mar en distintos tanques (Figura 3.10), los animales se anestesiaron con MS-222 y se sacrificaron por decapitación. Posteriormente se extrajeron los cerebros, los cuales fueron homogeneizados tal como se describió anteriormente y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

La medida de la actividad AChE en cerebro se realizó tal como se detalla en la sección 3.4.1, utilizando para ello una concentración final de ASCh de 0,40 mM.

Tabla 3.2. Dosis administradas por vía i.p. (mg/kg) de los distintos organofosforados en los ensayos preliminares dosis-respuesta.

Azinfosmetil	Diclorvos	Dimetoato	Paratión
2	8,8	10	2.3
3.2	11,7	14.3	3.5
4	23,3	20	7,5

Las dosis utilizadas en el estudio fueron seleccionadas tomando como referencia los valores tabulados de DL₅₀ por vía oral e i. p. para la rata (Tabla 3.3), estudios previos en peces que utilizan esta última vía y datos no publicados.

Tabla 3.3. Valores de la DL₅₀^{*} oral e intraperitoneal en rata

Organosfosforados	DL ₅₀ oral mg/kg	DL ₅₀ i. p. mg/kg
Azinfosmetil	11	4,9
Diclorvos	17	23,3
Dimetoato	500-680	198 [#]
Paration	1,8	0,716

Banco de datos de sustancias peligrosas (HSDB) de TOXNET - www.toxnet.nlm.nih.gov
 Environmental Health criteria 90 - <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc90.htm>



Figura 3.9. Administración de los compuestos organofosforados objeto de estudio por vía intraperitoneal.



Figura 3.10. Tanques utilizados en los ensayos *in vivo*

3. 7. 2. 2. Ensayos de recuperación de la actividad colinesterasa

Para llevar a cabo los ensayos de recuperación se utilizaron 15 ejemplares de *Sparus aurata*, de unos 300-500 g de peso (407 ± 91 g) y de longitud de entre 27 y 32 cm ($29,2 \pm 1,6$ cm). Los animales se trataron por vía i.p. con una única dosis subletal de cada OF: azinfosmetil (4 mg/kg), diclorvos (23,3 mg/kg), paratión (7,5 mg/kg) en aceite de maíz y dimetoato (20 mg/kg) en solución salina al 0,9%. Estas dosis fueron elegidas en base a los resultados hallados en los estudios preliminares, de manera que fueran capaces de provocar una inhibición significativa de la actividad ChE cerebral. El procedimiento seguido en los experimentos fue idéntico al señalado en el apartado anterior, excepto en el hecho de que los peces fueron sacrificados en lotes de 3 especímenes tras 3, 9, 24, 48 y 168 horas de permanencia en agua de mar. Los peces no fueron alimentados durante el procedimiento experimental.

Al igual que en los estudios *in vitro*, la actividad AChE en cerebro se midió directamente, mientras que en músculo se determinó tras inhibición durante 30' de la BChE con 10^{-5} M de iso-OMPA. Por su parte, la actividad BChE muscular se midió con BSCh como sustrato. En todos los casos la concentración de sustrato utilizada en la mezcla de reacción fue de 1,07 mM.

3. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el tratamiento estadístico de los datos de actividad colinesterasa de los que constan los diferentes estudios de inhibición en este trabajo fue necesario el uso de varios programas informáticos: SPSS para Windows versión 17.0, como programa de análisis estadístico, y como hoja de cálculo, EXCEL 2003 (integrado en el paquete ofimático MICROSOFT OFFICE 2003), programa necesario para la organización, gestión y presentación de los datos.

Para el análisis estadístico se verificó la hipótesis de normalidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk y para comprobar la homogeneidad de varianzas se utilizó el test de Levene. El nivel de significación para aceptar las hipótesis mediante estos test fue $p \leq 0,05$. En algunos casos en los que no se obtuvo normalidad u homocedasticidad se procedió a realizar una transformación de los datos (\sqrt{x}), con el fin de conseguir datos normales y homogéneos. Posteriormente se procedió a realizar un análisis de la varianza ANOVA de un factor para verificar en qué casos existían

diferencias significativas, teniendo en cuenta que para un nivel de significación $p < 0,05$, las diferencias halladas se consideran significativas. Una vez realizado el análisis de la varianza, en aquellos casos en los que se dieron diferencias significativas, se procedió a realizar un test de comparación de medias con el objeto de analizar qué tratamientos eran diferentes entre sí. Para ello se usó la prueba de rango múltiple (*post hoc*) LSD (least significant difference).

La dosis efectiva media (DE_{50}) de cada insecticida, definida como la dosis necesaria para inhibir un 50% la actividad de la AChE cerebral, fue estimada por el medio de interpolación lineal con la ayuda del programa estadístico ICPIN v.2.0 (Norberg-King, 1993).

El tratamiento estadístico y el programa utilizado para la realización de las gráficas y el análisis de datos en los estudios de actividad basal se han comentado previamente en el apartado correspondiente.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4. 1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS

Como primer paso en la caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro, músculo y plasma de *Sparus aurata* se realizaron distintos ensayos preliminares para estudiar, entre otros aspectos, la influencia del pH sobre la actividad medida y la especificidad de sustrato utilizando diferentes tiocolinas alquil sustituidas (ASCh, A β MSCh, BSCh y PSCh). En base a estos resultados se estudiaron los parámetros cinéticos de las enzimas y se analizó su comportamiento frente a varios inhibidores específicos.

4. 1. 1. ESTUDIOS PRELIMINARES

La Figura 4.1 muestra la influencia del pH (rango 5,7-9,2) sobre la actividad ChE presente en el cerebro. Como se observa en la figura, utilizando los sustratos ASCh y A β MSCh, la mayor actividad colinesterasa se midió a pH 7,4, mientras que los valores obtenidos con los otros sustratos PSCh y BSCh mostraron un ligero aumento a medida que se incrementaban los valores de pH, aunque poco significativo.

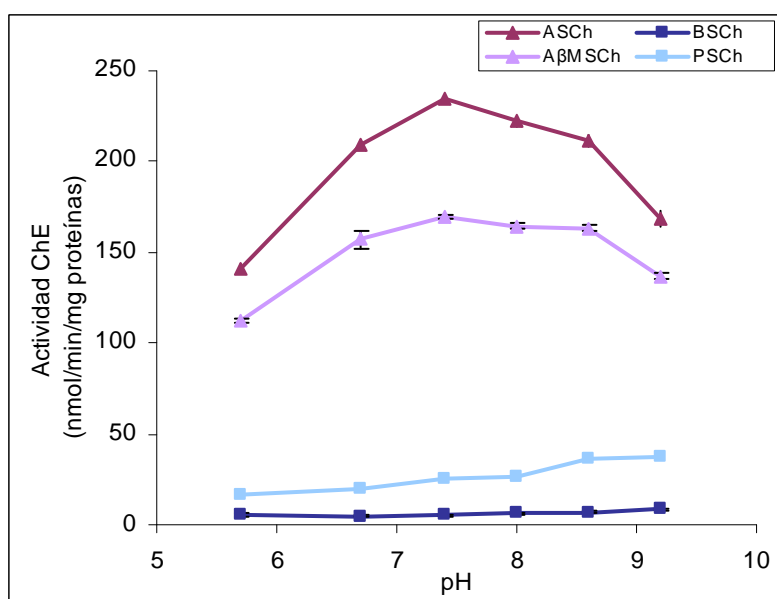


Figura 4.1. Efectos del pH sobre la actividad colinesterasa presente en el cerebro de *Sparus aurata* medida sobre ASCh, A β MSCh, PSCh y BSCh (concentración final 0,40 mM). Los datos representados son la media de tres determinaciones independientes y las barras de error indican el error estándar.

En el caso del tejido muscular, la actividad aumentó al hacerlo el pH, alcanzando valores máximos a pH 8,6 sobre ASCh, A β MSCh y PSCh, mientras que sobre BSCh se mantuvo constante a partir de este valor (Figura 4.2).

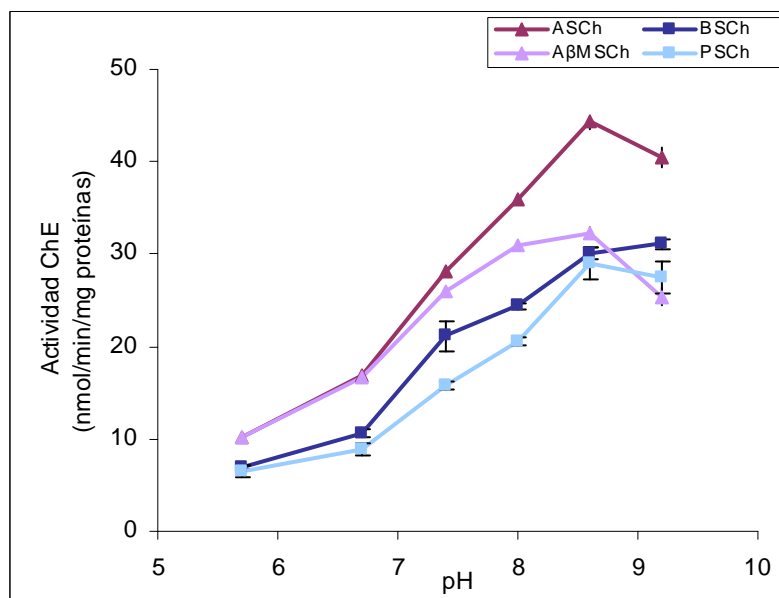


Figura 4.2. Efectos del pH sobre la actividad colinesterasa presente en el músculo de *Sparus aurata* medida sobre ASCh, A β MSCh, PSCh y BSCh (concentración final 0,40 mM). Los datos representados son la media de tres determinaciones independientes y las barras de error indican el error estándar.

Por lo que respecta al plasma, los datos obtenidos indican que la actividad sobre BSCh y PSCh muestra una tendencia ligeramente ascendente al aumentar el pH; sin embargo, utilizando ASCh y A β MSCh como sustratos, se obtiene un mínimo de actividad colinesterasa a pH 6,7, aumentando la actividad por encima y por debajo de este valor de pH (Figura 4.3).

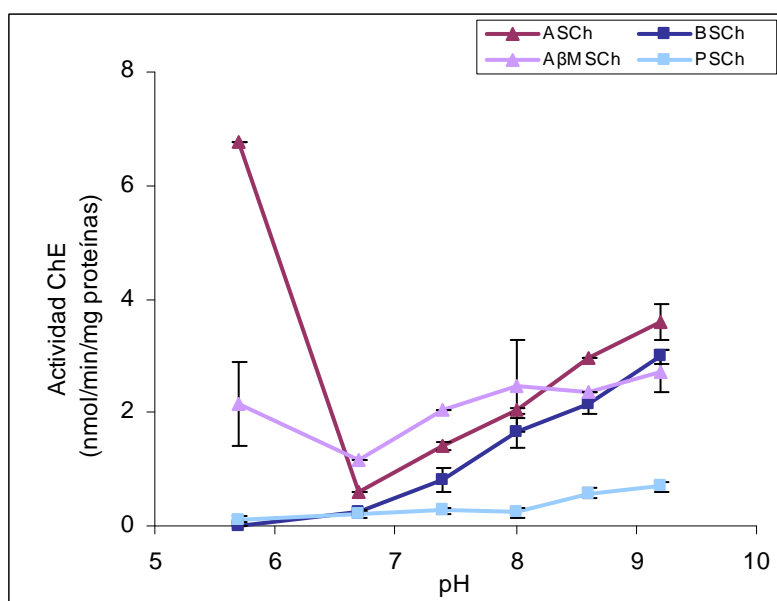


Figura 4.3. Efectos del pH sobre la actividad colinesterasa presente en plasma de *Sparus aurata* medida ASCh, AβMSCh, PSCh y BSCh (concentración final 0,40 mM). Los datos representados son la media de tres determinaciones independientes y las barras de error indican el error estándar.

A pesar de que en músculo y plasma se obtuvieron valores de actividad más altos a valores de pH entre 8 y 9, teniendo en cuenta que paralelamente también aumenta la hidrólisis no enzimática del sustrato y, por lo tanto, se reduce la sensibilidad del ensayo y, además, el DTNB es menos estable a pH 8 que a valores de pH más bajos (Ellman y col., 1961), el valor de pH elegido para todos los estudios posteriores de plasma, cerebro y músculo fue de 7,4.

4. 1. 2. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO Y PARÁMETROS CINÉTICOS

4. 1. 2. 1. Especificidad de sustrato (ensayos preliminares)

La Tabla 4.1 y la Figura 4.4 resumen los resultados preliminares obtenidos para la actividad ChE presente en cerebro, músculo y plasma, medida a pH 7,4 con una única concentración de los cuatro sustratos utilizados (concentración final 0,40 mM de ASCh, AβMSCh, PSCh y BSCh). La mayor afinidad por el sustrato se obtuvo

con ASCh, siendo la actividad ChE en cerebro de $242,19 \pm 0,43$ nmol/min/mg proteínas y en músculo de $16,72$ nmol/min/mg proteínas (100%), mientras que los sustratos A β MSCh, PSCh y BSCh fueron hidrolizados a menor velocidad en estos tejidos. Concretamente, la hidrólisis de A β MSCh se llevó a cabo a un 76,0% y un 85,5% de la velocidad de hidrólisis de la ASCh en cerebro y músculo, respectivamente. La actividad sobre PSCh fue un 10,0% y un 75,2% de la actividad medida en presencia de ASCh en cerebro y músculo, respectivamente, mientras que la actividad medida con BSCh fue solo un 1,6% de la actividad total medida con ASCh en cerebro y un 62,0% en músculo. Bajo las mismas condiciones experimentales, la actividad enzimática específica detectada en el plasma de la dorada fue muy baja en presencia de todos los sustratos utilizados (Tabla 4.1), entre 0,1-6,1% de la presente en cerebro y entre 0,6-2,2% de la medida en músculo, aunque también en este caso la ASCh fue el sustrato hidrolizado a una mayor velocidad ($0,28$ nmol/min/mg proteínas). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió no realizar posteriores estudios con esta última muestra biológica.

Con fines comparativos se calculó la actividad colinesterasa medida sobre ASCh, BSCh, A β MSCh y PSCh por volumen de plasma, que fue de $6,71 \pm 0,38$ nmol/min/mL, $5,57 \pm 0,54$ nmol/min/mL, $2,12 \pm 0,00$ nmol/min/mL y $3,79 \pm 0,45$ μ mol/min/mL, respectivamente. En la Tabla 4.2 se recogen los valores de actividad en distintas especies de peces medidas sobre los sustratos ASCh y BSCh. En todos los casos se detecta actividad AChE ($18,2$ - 9350 nmol/min/mL), aunque en la mayoría la actividad medida sobre BSCh es mayor (rango $10,0$ - 21720 nmol/min/mL). Concretamente con este sustrato, se han descrito (Chuiiko y col., 2003) niveles altos de BChE en plasma en ciprínidos como *Abramis ballerus* ($18,1 \times 10^3$ nmol/min/mL), *Alburnus alburnus* ($16,3 \times 10^3$ nmol/min/mL) y *Rutilus rutilus* ($17,5 \times 10^3$ nmol/min/mL), aunque otros peces presentaban niveles indetectables ($<0,17$ nmol/min/mL) como los ciprínidos *Cyprinus carpio carpio*, *Pelecus cultratus* y *Carassius carassius*, el esócido *Esox lucius*, distintos pércidos (*Stizostedion lucioperca*, *Stizostedion volgensis*, *Gymnocephalus cernua* y *Perca fluviatilis*) y *Lota lota*, perteneciente a la familia de los lótididos. Por su parte, Salles y col., (2006) encontraron niveles variables de ambas enzimas en el suero de distintas especies de peces neotropicales (Tabla 4.2). El significado fisiológico de tales diferencias interespecíficas no se conoce (Salles y col., 2006).

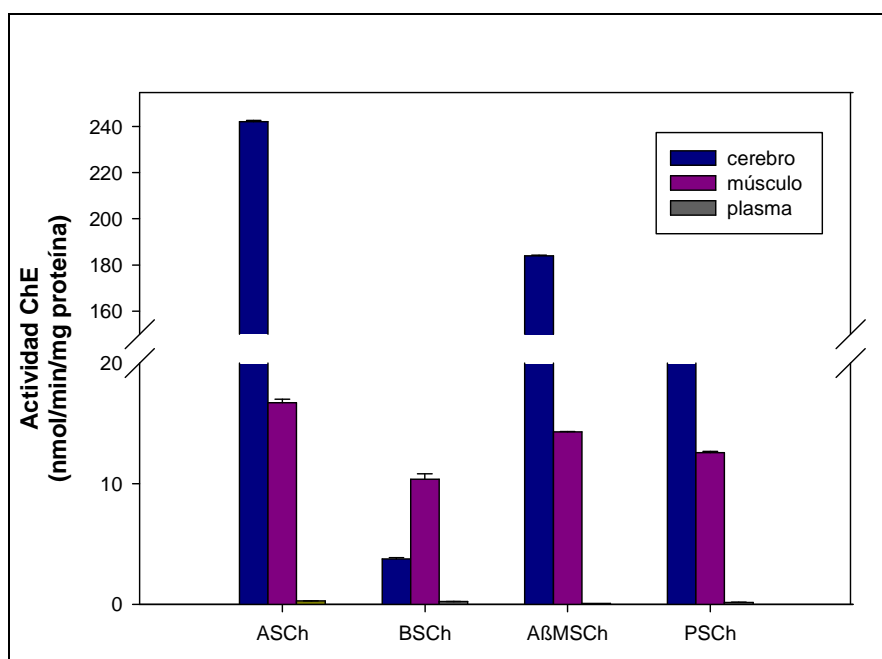


Figura 4.4. Comparación de la actividad colinesterasa presente en el cerebro, músculo y plasma de *Sparus aurata* con diferentes sustratos (ASCh, BSCh, AβMSCh y PSCh). La concentración final utilizada fue de 0,40 mM. Los valores representan las medias de las tres réplicas y las barras de error muestran su error estándar.

Tabla 4.1. Actividad ChE de los distintos tejidos estudiados medida sobre los sustratos específicos.

Tejidos	ASCh	AβMSCh	BSCh	PSCh
Cerebro	242,19±0,43 (100%)	183,98±0,31 (76,0%)	3,77±0,11 (1,6%)	24,32±0,07 (10,0%)
Músculo	16,72±0,29 (100%)	14,29±0,04 (85,5%)	10,37±0,45 (62,0%)	12,58±0,10 (75,2%)
Plasma	0,28±0,02 (100%)	0,09±0,00 (32,1%)	0,23±0,02 (82,1%)	0,16±0,02 (57,1%)

La actividad ChE (±eem) se expresa como nmol/min/mg proteínas.

Tabla 4.2. Valores de actividad ChE (nmol/min/mL) en plasma y suero de diferentes especies de peces medidas sobre los sustratos ASCh y BSCh.

Especie	Muestra	ASCh	BSCh	Referencia
<i>Abramis ballerus</i> (D)	Suero	nd	14771,7	Chuiko, 2000
<i>Abramis brama</i> (D)	Suero	nd	3711,7	Chuiko, 2000
<i>Alburnus alburnus</i> (D)	Suero	nd	16171,7	Chuiko, 2000
<i>Blicca bjoerkna</i> (D)	Suero	nd	9265,0	Chuiko, 2000
<i>Brycon cephalus</i> (D)	Suero	150,0	240,0	Salles y col., 2006
<i>Cyprinus carpio</i> (D)	Suero	104,7	-	Chuiko, 2000
<i>Cyprocharax gilbert</i> (D)	Suero	7160,0	8220,0	Salles y col., 2006
<i>Esox lucius</i> (D)	Suero	84,5	nd	Chuiko, 2000
<i>Geophagus brasiliensis</i> (M)	Suero	30,0	nd	Salles y col., 2006
<i>Hoplias malabaricus</i> (D)	Suero	300,0	20,0	Salles y col., 2006
<i>Hypostomus punctatus</i> (D)	Suero	250,0	nd	Salles y col., 2006
<i>Leporinus macrocephalus</i> (D)	Suero	9350,0	21720,0	Salles y col., 2006
<i>Leuciscus idus</i> (D)	Suero	nd	3275,0	Chuiko, 2000
<i>Perca fluviatilis</i> (D)	Suero	20,8	nd	Chuiko, 2000
<i>Piaractus brachypomus</i> (D)	Suero	260,0	550,0	Salles y col., 2006
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (D)	Suero	740,0	1030,0	Salles y col., 2006
<i>Prochilodus lineatus</i> (D)	Suero	3020,0	5850,0	Salles y col., 2006
<i>Rutilus rutilus</i> (D)	Suero	nd	2730,0	Chuiko, 2000
<i>Salminus brasiliensis</i> (D)	Suero	140,0	10,0	Salles y col., 2006
<i>Stizostedion lucioperca</i> (D)	Suero	18,2	nd	Chuiko, 2000
<i>Abramis ballerus</i> (D)	Plasma	283,3	18050,0	Chuiko y col., 2003
<i>Abramis brama</i> (D)	Plasma	70,0	1450,0	Chuiko y col., 2003
<i>Alburnus alburnus</i> (D)	Plasma	193,3	16250,0	Chuiko y col., 2003
<i>Aspius aspius</i> (D)	Plasma	40,0	433,3	Chuiko y col., 2003
<i>Blicca bjoerkna</i> (D)	Plasma	81,7	8050,0	Chuiko y col., 2003
<i>Carassius carassius</i> (D)	Plasma	176,7	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Cyprinus carpio</i> (D)	Plasma	80,0	-	Murphy y col., 2005

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

Tabla 4.2. Continuación. Valores de actividad (nmol/min/mL) en plasma y suero de diferentes especies de peces medidas sobre los sustratos ASCh y BSCh.

Especie	Muestra	ASCh	BSCh	Referencia
<i>Cyprinus carpio</i> (D)	Plasma	105,0	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Esox lucius</i> (D)	Plasma	81,7	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Gymnocephalus cernua</i> (D)	Plasma	26,7	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Leuciscus idus</i> (D)	Plasma	31,7	3950,0	Chuiko y col., 2003
<i>Lota lota</i> (D)	Plasma	25,0	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Pelecus cultratus</i> (D)	Plasma	96,7	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Perca fluviatilis</i> (D)	Plasma	46,7	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Rutilus rutilus</i> (D)	Plasma	310,0	17466,7	Chuiko y col., 2003
<i>Stizostedion lucioperca</i> (D)	Plasma	20,0	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Stizostedion volgensis</i> (D)	Plasma	36,7	nd	Chuiko y col., 2003
<i>Sparus aurata</i> (M)	Plasma	6,7	5,6	Este estudio

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

4. 1. 2. 2. Parámetros cinéticos

Para la estimación de los parámetros cinéticos se determinó la actividad ChE usando diferentes concentraciones de los sustratos más utilizados en la bibliografía, ASCh para el cerebro y ASCh y BSCh para el músculo. El sustrato BSCh no se empleó en el caso del cerebro al comprobarse en los ensayos preliminares que casi no era hidrolizado. Para las concentraciones utilizadas, la actividad ChE en cerebro mostró una cinética de Michaelis-Menten (Figura 4.5), observándose un ligero descenso de la actividad con la concentración más alta utilizada (3,21 mM), siendo excluida del cálculo de los parámetros cinéticos. La curva ajustada y el correspondiente diagrama de Lineaweaver-Burk o de dobles recíprocos se observan en la Figura 4.6. Las constantes cinéticas obtenidas por regresión no-lineal por mínimos cuadrados (método riguroso) obtenidos mediante el programa Enzyme Kinetic Pro versión 2.36 se encuentran en la Tabla 4.3. Este método arrojó valores para la velocidad máxima (V_{\max}) de $243,09 \pm 2,76$ nmol/min/mg proteínas y para constante aparente de Michaelis (K_m) de $0,16 \pm 0,01$ mM.

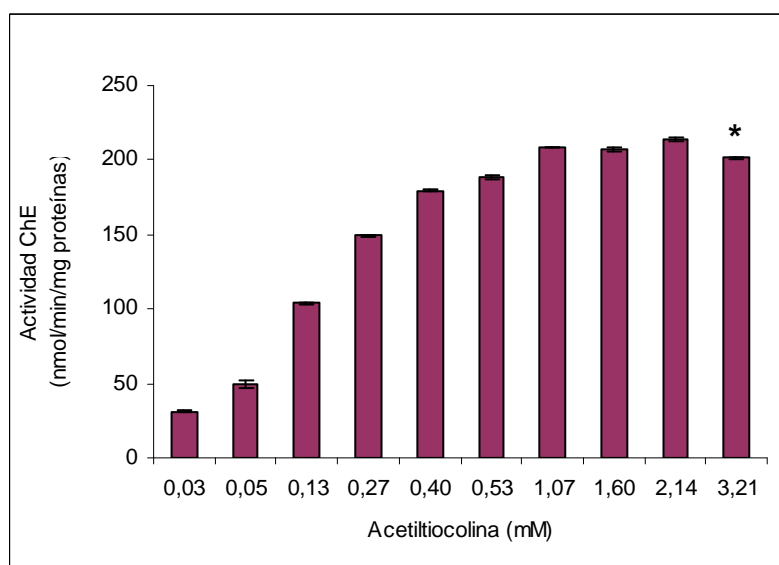


Figura 4.5. Efecto de la concentración del sustrato acetiltiocolina sobre la actividad colinesterasa presente en cerebro de *Sparus aurata*. Cada columna representa la media de tres réplicas con sus correspondientes barras de error estándar. El valor marcado con asterisco se excluyó para el cálculo de los parámetros cinéticos.

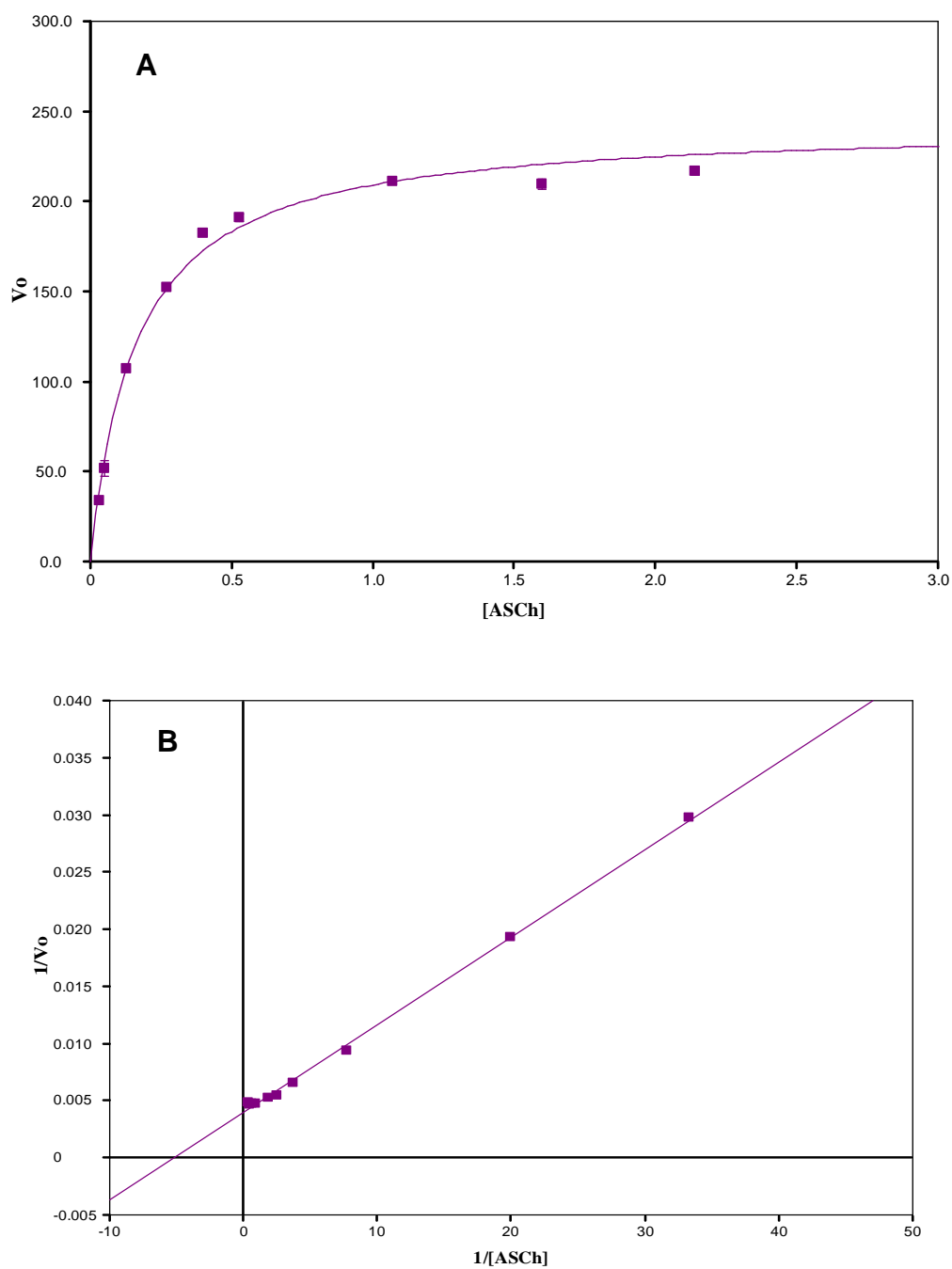


Figura 4.6. Representación de (A) Michaelis-Menten y (B) Lineaweaver-Burk para la actividad colinesterasa en cerebro de *Sparus aurata* en presencia de diferentes concentraciones de ASCh.

Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran cómo evoluciona la actividad enzimática en músculo con diferentes concentraciones de ASCh y BSCh, respectivamente. Los resultados obtenidos experimentalmente se ajustan a un modelo de Michaelis-Menten (Figuras 4.7.A y 4.8.A) y se obtuvieron gráficos de Lineaweaver-Burk lineales en el rango de concentraciones estudiado (Figuras 4.7.B y 4.8.B). Los valores estimados para la V_{\max} y la K_m de la ChE muscular para el sustrato ASCh fueron $32,21 \pm 0,89$ nmol/min/mg proteínas y $0,24 \pm 0,02$ mM, respectivamente; mientras que para el sustrato BSCh la V_{\max} presentó un valor de $16,07 \pm 0,56$ nmol/min/mg proteínas y la K_m de $0,16 \pm 0,01$ mM (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Parámetros cinéticos (media \pm d.e.) de las enzimas colinesterasas presentes en cerebro y músculo de *Sparus aurata* para la hidrólisis de los sustratos ASCh y BSCh.

Tejido	Sustrato	K_m (mM)	V_{\max} (nmol/min/mg)	V_{\max}/K_m (mL/min/mg)
Cerebro	ASCh	$0,16 \pm 0,01$	$243,09 \pm 2,76$	1,519
Músculo	ASCh	$0,24 \pm 0,02$	$32,21 \pm 0,89$	0,134
Músculo	BSCh	$0,16 \pm 0,01$	$16,07 \pm 0,56$	0,100

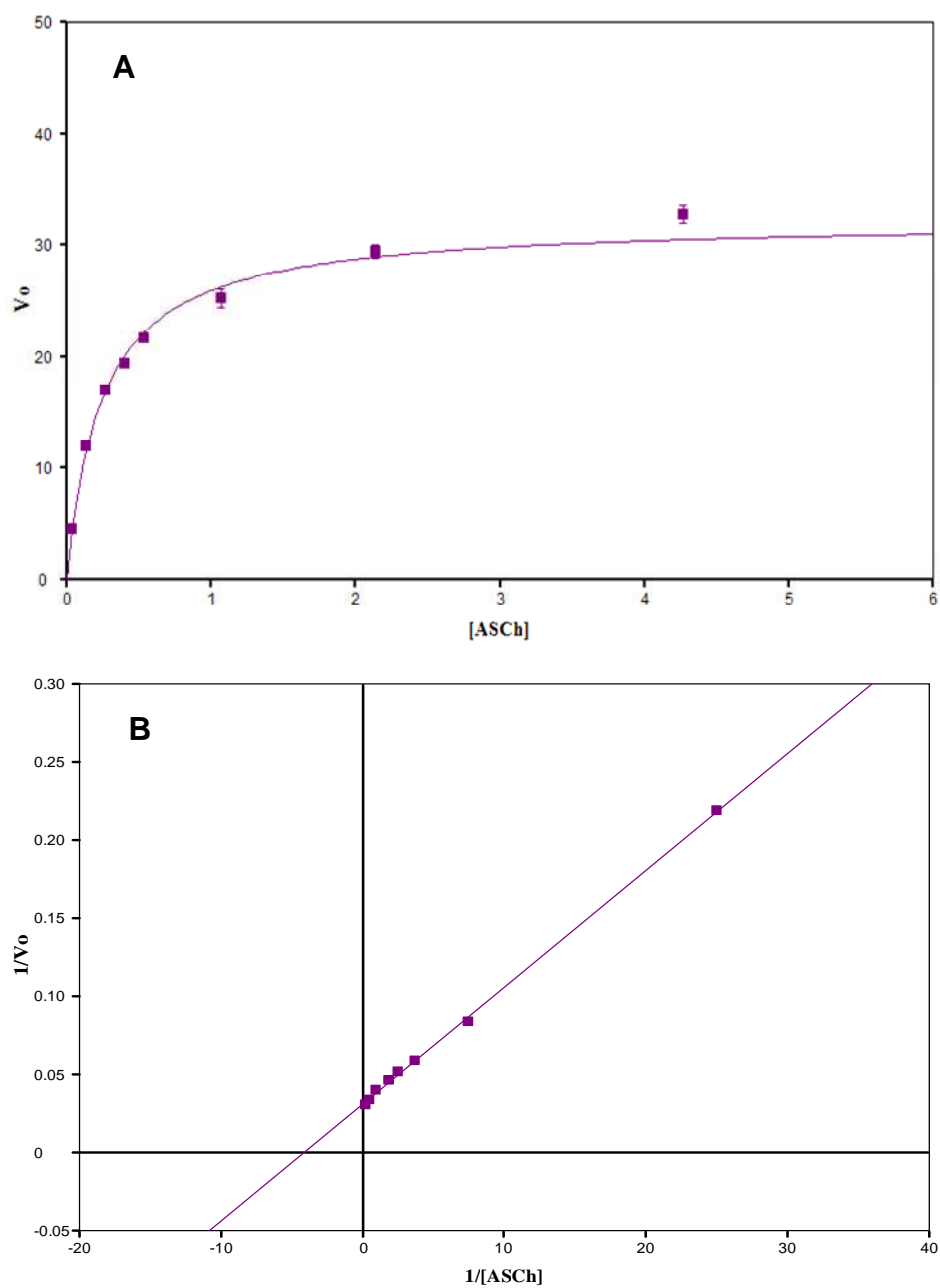


Figura 4.7. Representación de (A) Michaelis-Menten y (B) Lineaweaver-Burk para la actividad colinesterasa en músculo de *Sparus aurata* en presencia de diferentes concentraciones de ASCh.

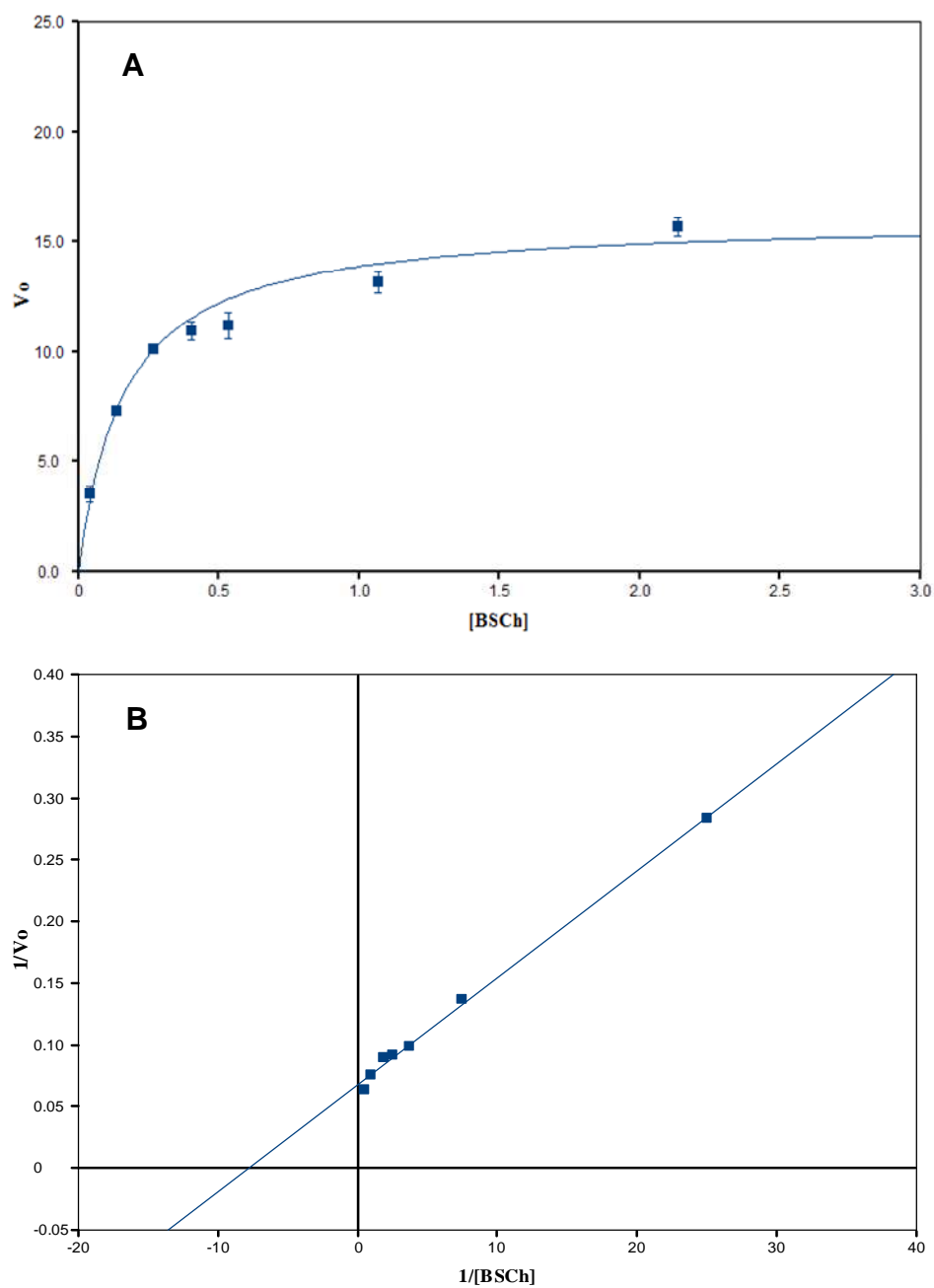


Figura 4.8. Representación de (A) Michaelis-Menten y (B) Lineaweaver-Burk para la actividad colinesterasa en músculo de *Sparus aurata* en presencia de diferentes concentraciones de BSCh.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para la realización de las posteriores experiencias en ambos tejidos se eligió la concentración de 1,07 mM de ASCh y de BSCh. Esta concentración de sustrato es varias veces superior a las correspondientes K_m de las enzimas, por lo que podemos afirmar que nos encontramos en la zona de saturación y que la actividad medida es función de la concentración del enzima.

4. 1. 3. EFECTO *in vitro* DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS

Para la caracterización de las ChE presentes en cerebro y músculo de la dorada, además de estudiar la especificidad sobre varios sustratos (ASCh, A β MSCh, BSCh y PSCh), se estudió su comportamiento frente a distintos inhibidores específicos: eserina, iso-OMPA y BW284c51, selectivos para ChE, BChE y AChE, respectivamente.

4. 1. 3. 1. Cerebro

Las Figuras 4.9-4.17 ilustran el efecto de los tres inhibidores sobre la hidrólisis de ASCh, A β MSCh, BSCh y PSCh en los homogenizados de cerebro de dorada, lo cual se resume en la Figura 4.18. Los resultados muestran una inhibición significativa tras la incubación durante 30 minutos con concentraciones de eserina a partir de 10^{-7} o 10^{-6} M en presencia de ASCh, A β MSCh y PSCh (Figura 4.18.A). Esta inhibición fue casi completa a la concentración más alta usada (10^{-3} M). Por ejemplo, la actividad medida se redujo en un 98,8% respecto a los valores control en el caso de la ASCh, el sustrato hidrolizado a mayor velocidad de los utilizados. Esto confirma que la actividad medida se debe a las ChE y no a otro tipo de esterasas.

Similares resultados se obtuvieron con el inhibidor selectivo de la acetilcolinesterasa, BW284c51, obteniéndose valores porcentuales de inhibición de la actividad sobre todos los sustratos que son superiores al 97,5% con una concentración de 10^{-3} M de dicho inhibidor (Figura 4.18.B). Sin embargo, la actividad ChE cerebral no se vió afectada por ninguna de las concentraciones utilizadas del inhibidor iso-OMPA, específico de la butirilcolinesterasa (Figura 4.18.C).

En resumen, el comportamiento de la ChE presente en el cerebro de la dorada justifica su clasificación como AChE en todos los aspectos: hidroliza a ASCh y A β MSCh pero no muestra actividad sobre el sustrato BSCh, es sensible a BW284c51 pero es resistente a iso-OMPA, y muestra inhibición por sustrato.

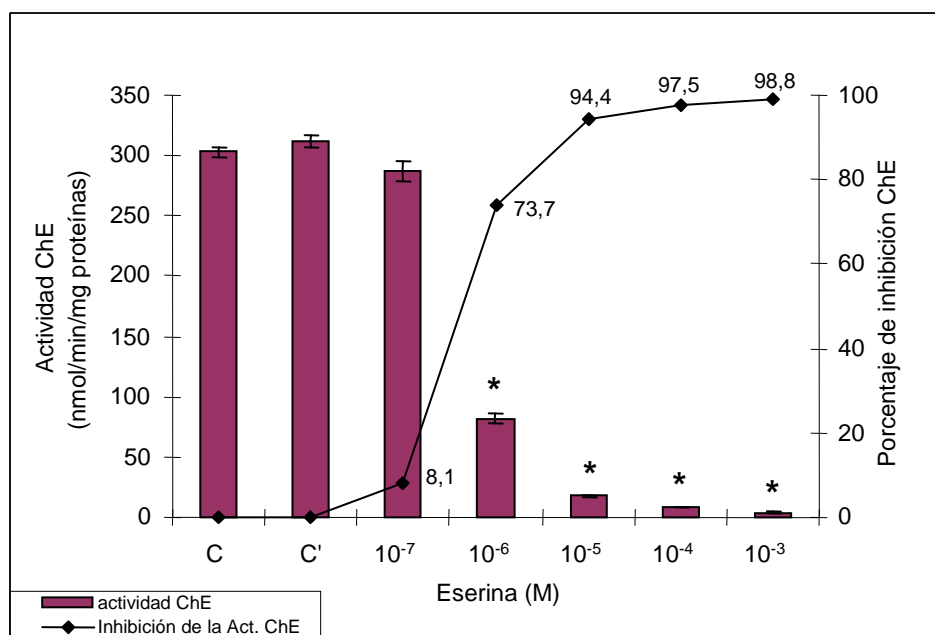


Figura 4.9. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata* utilizando ASCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$). Las barras expresan la media \pm eem de la actividad ChE y la línea muestra el % de inhibición de la enzima.

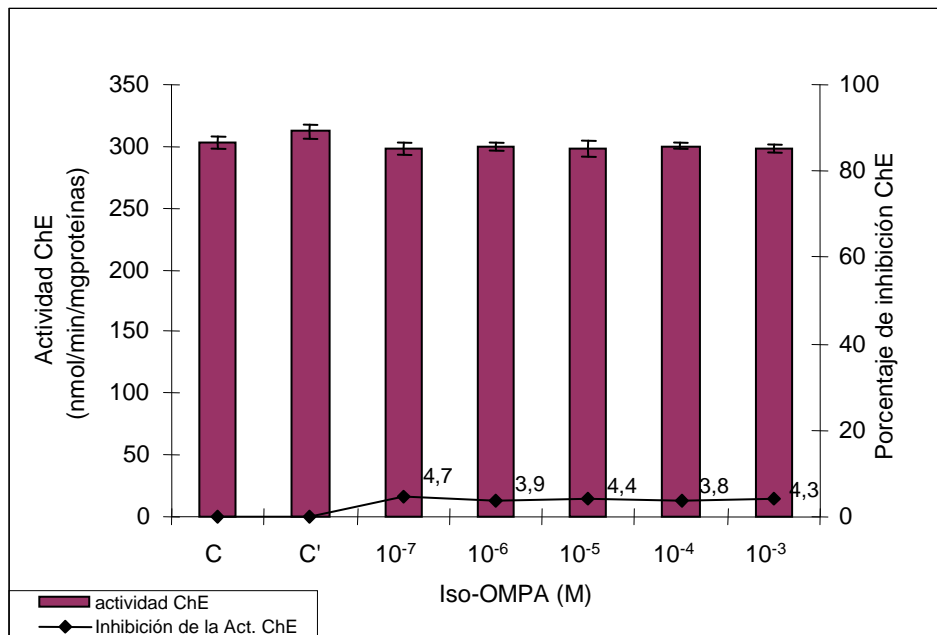


Figura 4.10. Efecto del inhibidor iso-OMPA sobre la actividad enzimática en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando ASCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

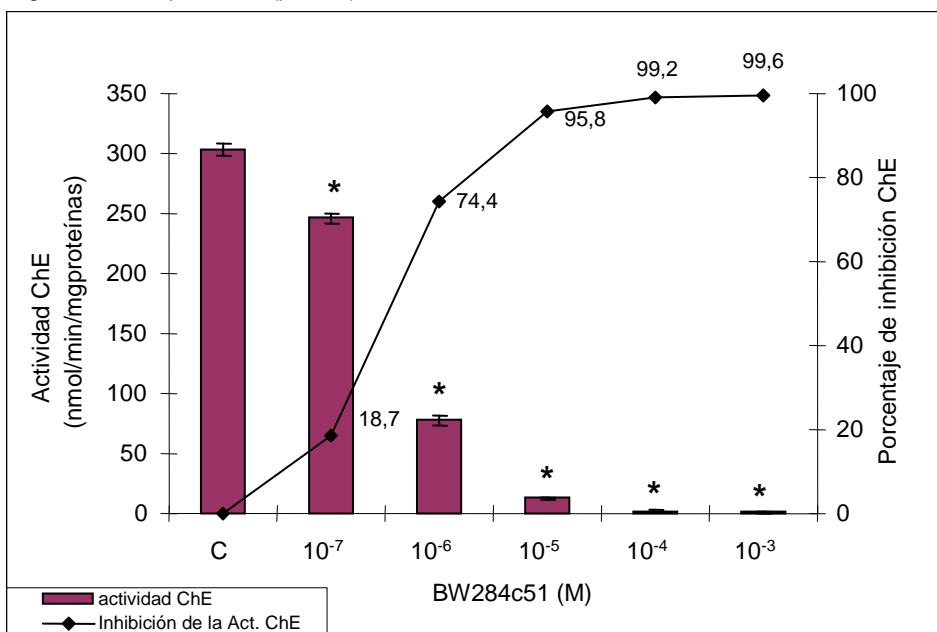


Figura 4.11. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad enzimática en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando ASCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

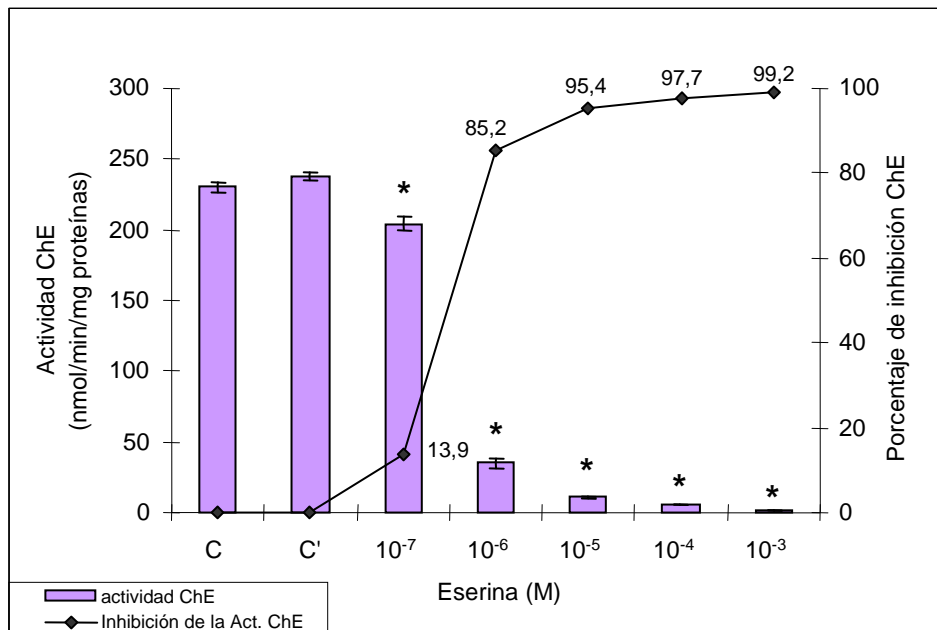


Figura 4.12. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando A β MSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliQ; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$)

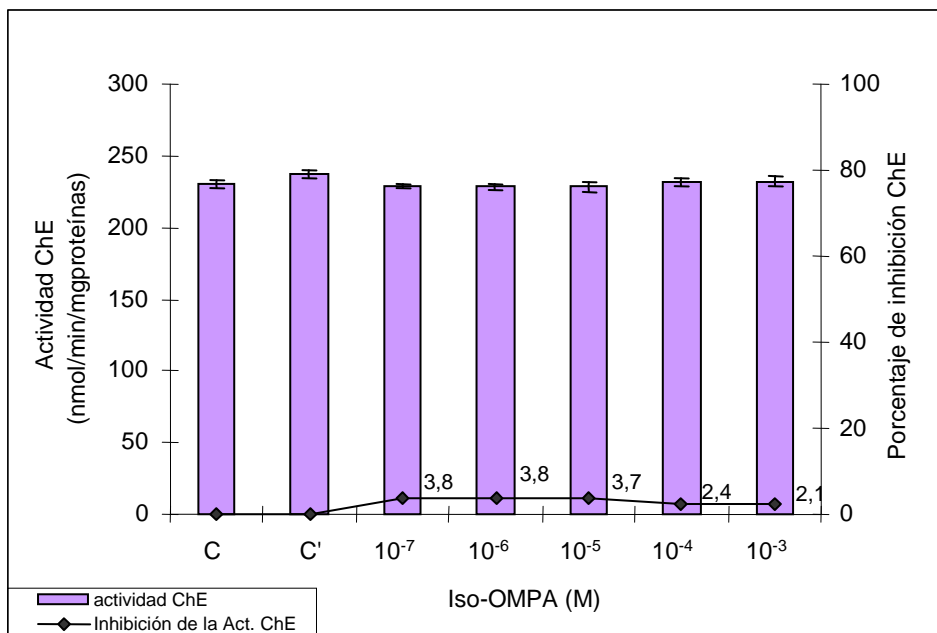


Figura 4.13. Efecto del inhibidor iso-OMPA sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando A β MSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliQ; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

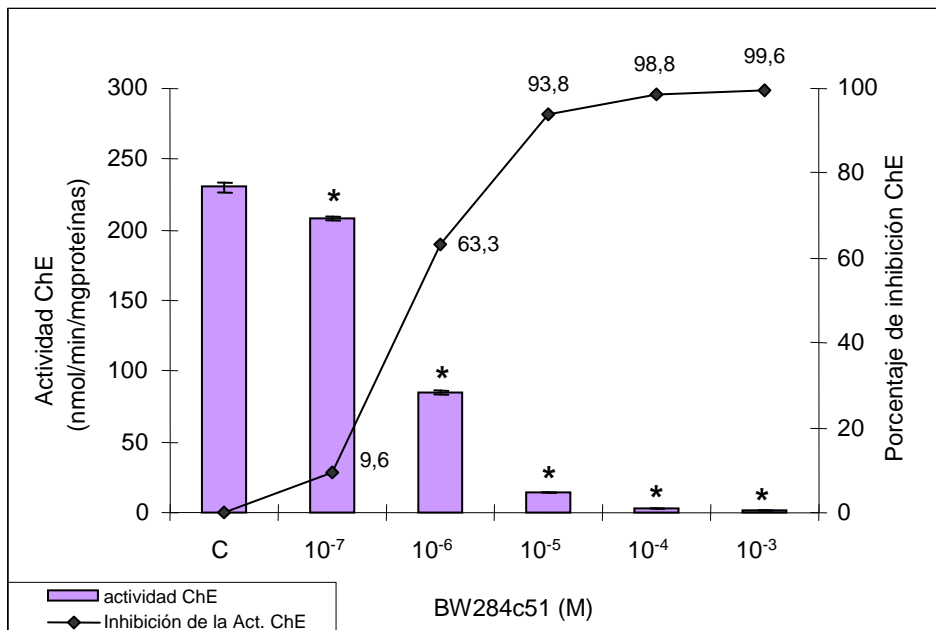


Figura 4.14. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando A β MSCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

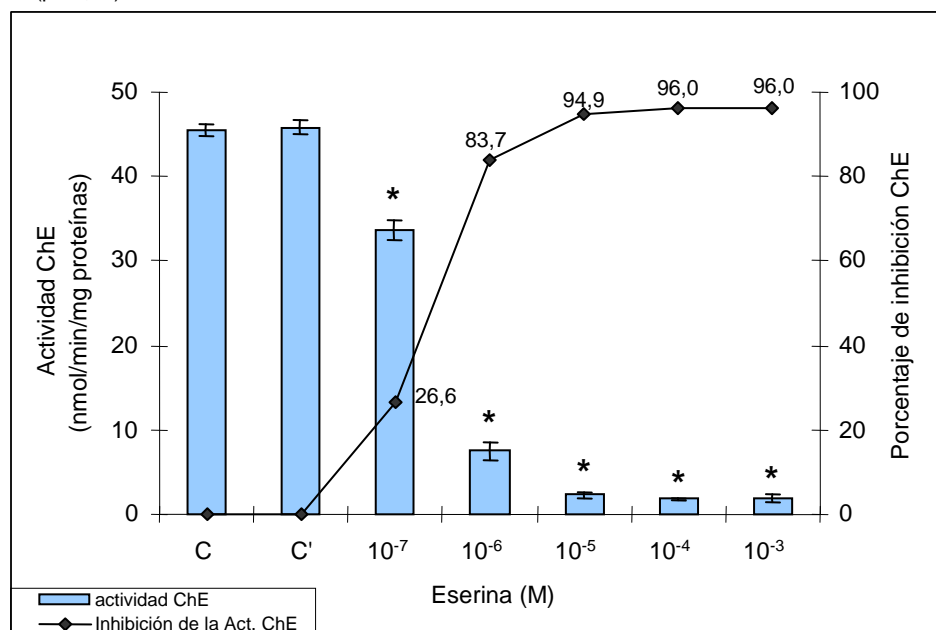


Figura 4.15. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando PSCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

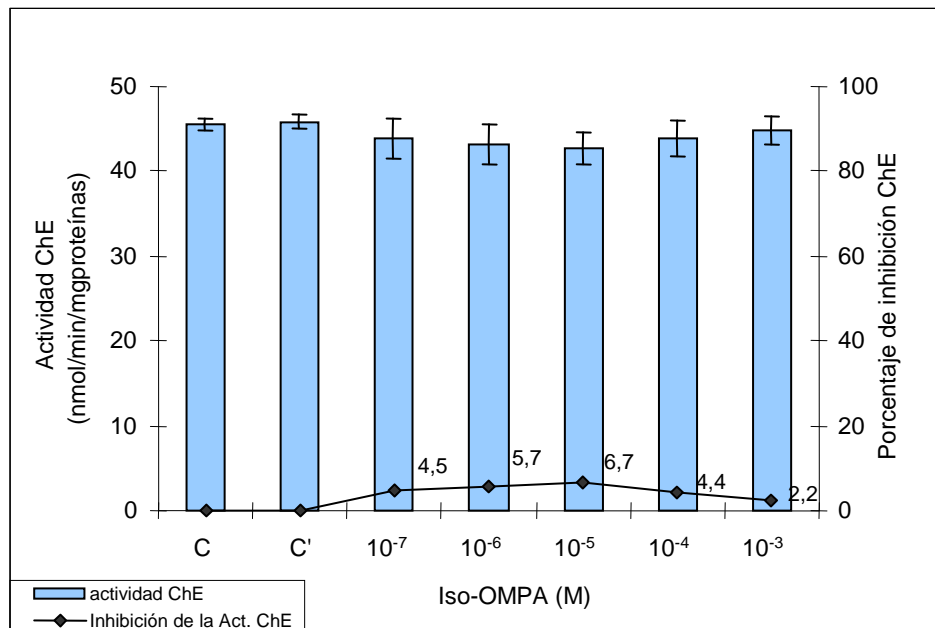


Figura 4.16. Efecto del inhibidor iso-OMPA sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando PSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

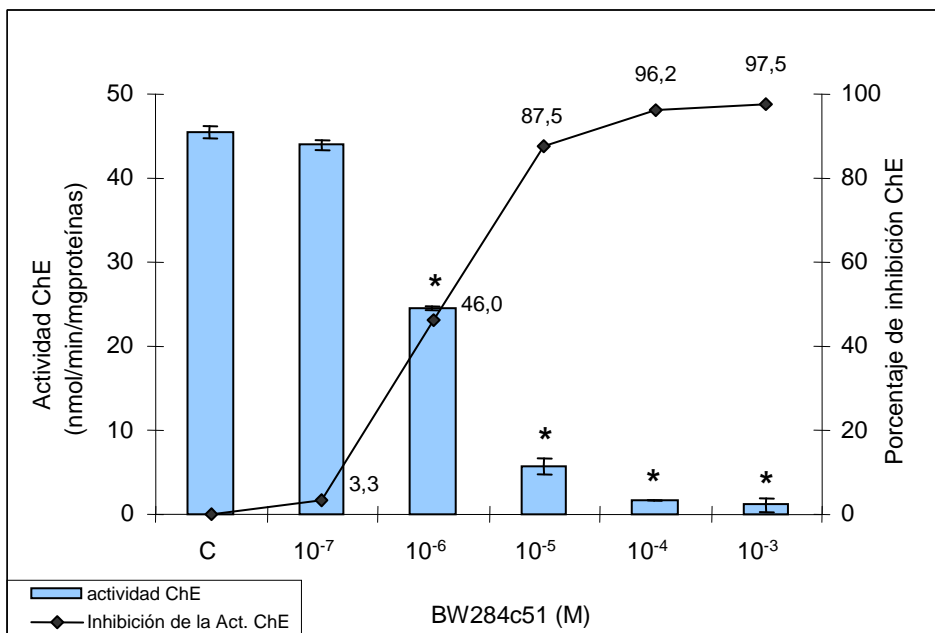


Figura 4.17. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad ChE en cerebro de *Sparus aurata*, utilizando PSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

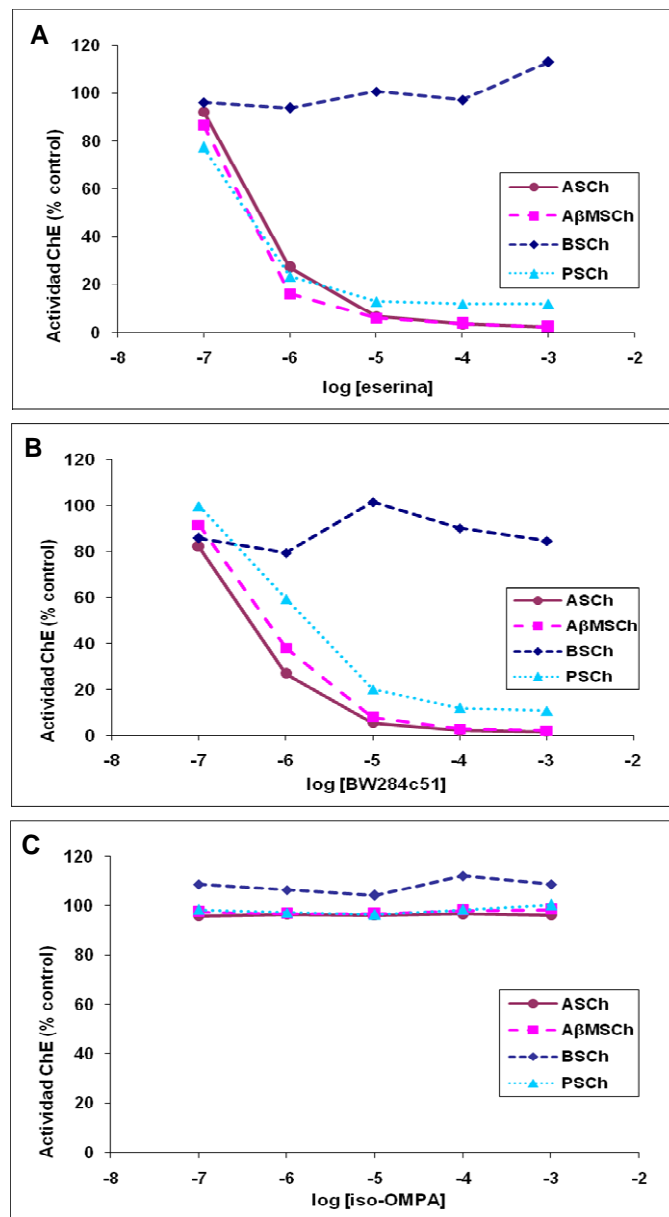


Figura 4.18. Resumen de los efectos *in vitro* de diversos inhibidores específicos sobre la actividad colinesterasa (ChE) cerebral en *Sparus aurata*: (A) eserina, (B) BW284c51 y (C) iso-OMPA (concentración en M). Los valores representan la actividad residual sobre diferentes sustratos (ASCh, AβMSCh, BSCh, PSCh) tras 30 min de incubación con el inhibidor. Los símbolos representan los valores medios de tres determinaciones.

4. 1. 3. 2. Músculo

En la Figura 4.31 se resumen los resultados de la inhibición por eserina, iso-OMPA y BW284C51 sobre la hidrólisis de ASCh, A β MSCh, PSCh y BSCh en los homogeneizados de músculo de *Sparus aurata*, los cuales se encuentran expuestos de forma detallada en las Figuras 4.19 a 4.30.

Por lo que respecta al inhibidor eserina (Figura 4.31.A) puede observarse que con los cuatro sustratos se produce la inhibición casi completa de la actividad enzimática a concentraciones de 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M, confirmando que la actividad medida en nuestras condiciones experimentales se debe a la presencia de enzimas colinesterasas y no a otro tipo de esterasas.

El compuesto BW284c51 inhibe la actividad enzimática medida en músculo sobre los cuatro sustratos de forma concentración dependiente (Figura 4.31.B), siendo esta inhibición significativa a partir de la concentración de 10^{-7} M (ASCh, A β MSCh y BSCh) y 10^{-5} M (PSCh). A la máxima concentración utilizada (10^{-3} M), la inhibición alcanzó valores del 95,9% y 93,3% para ASCh y A β MSCh, respectivamente. Estos resultados sugieren la presencia de AChE, ya que ésta es fuertemente inhibida por el BW284c51. Asimismo, la actividad medida usando BSCh y PSCh como sustratos fue inhibida también de forma significativa por este compuesto (86,4% y 88,2%, respectivamente, con 10^{-3} M), lo que aporta cierta evidencia de la presencia de ChE atípica, que hidroliza sustratos diagnósticos para BChE pero es sensible a BW284c51, un inhibidor de AChE.

Por otro lado, el efecto de iso-OMPA sobre la actividad ChE muscular dependió del sustrato. Concentraciones iguales o superiores a 10^{-5} M inhibieron completamente la actividad sobre BSCh y solo parcialmente la actividad medida con ASCh, A β MSCh y PSCh (Figura 4.31.C). Al aumentar la concentración de iso-OMPA desde 10^{-5} a 10^{-3} M no se produjo un efecto inhibitorio adicional sobre la actividad medida sobre estos últimos sustratos. En resumen, en el músculo de la dorada parecen estar presentes una fracción ChE resistente y otra sensible al iso-OMPA. La fracción resistente a iso-OMPA de la colinesterasa muscular mostró actividad sobre ASCh, A β MSCh y PSCh, mientras que la fracción sensible a este inhibidor mostró actividad sobre ASCh, A β MSCh, PSCh y BSCh.

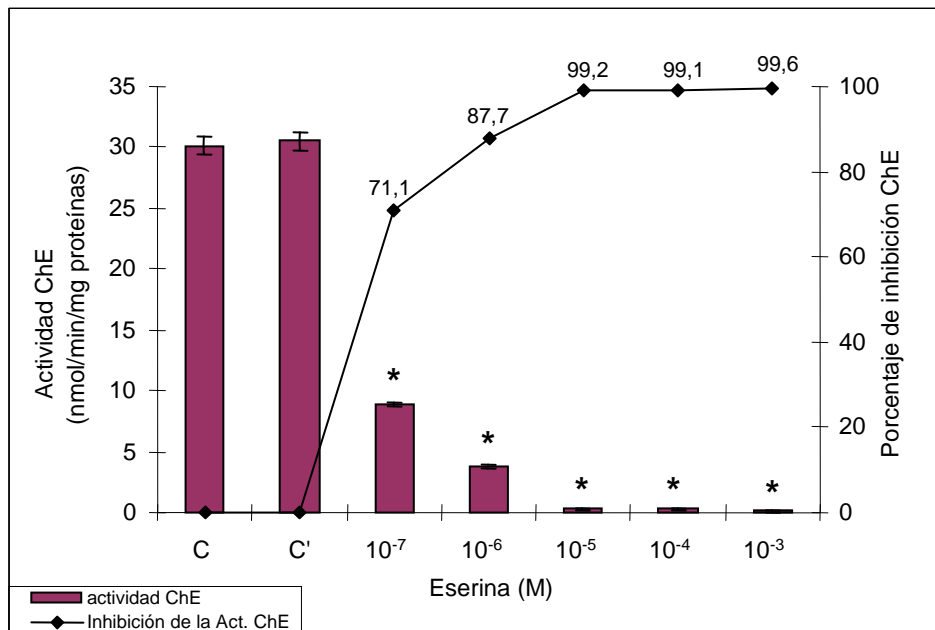


Figura 4.19. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando ASCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; C' = Control MEtOH; * = diferencias estadísticamente significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

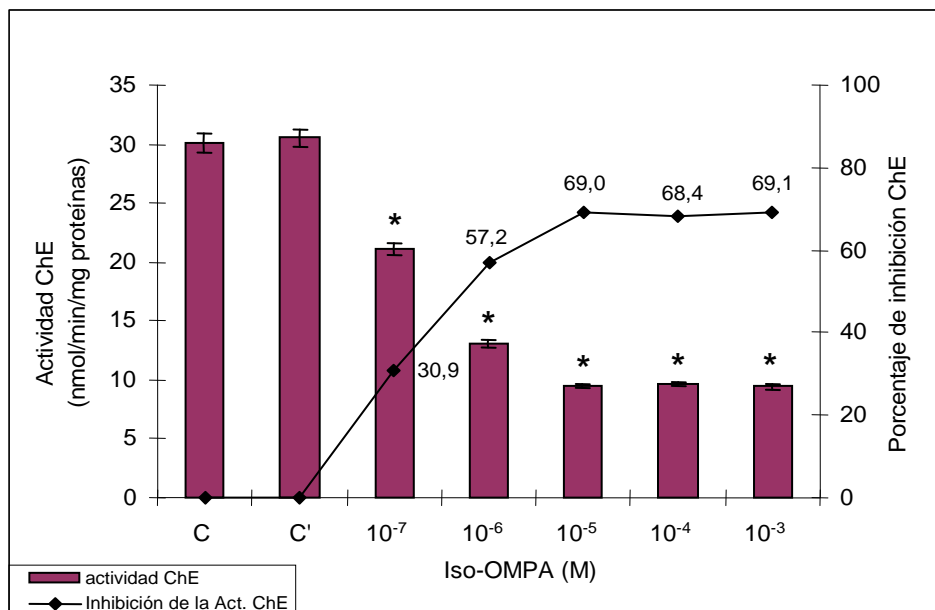


Figura 4.20. Efecto del inhibidor iso-OMPA sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando ASCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

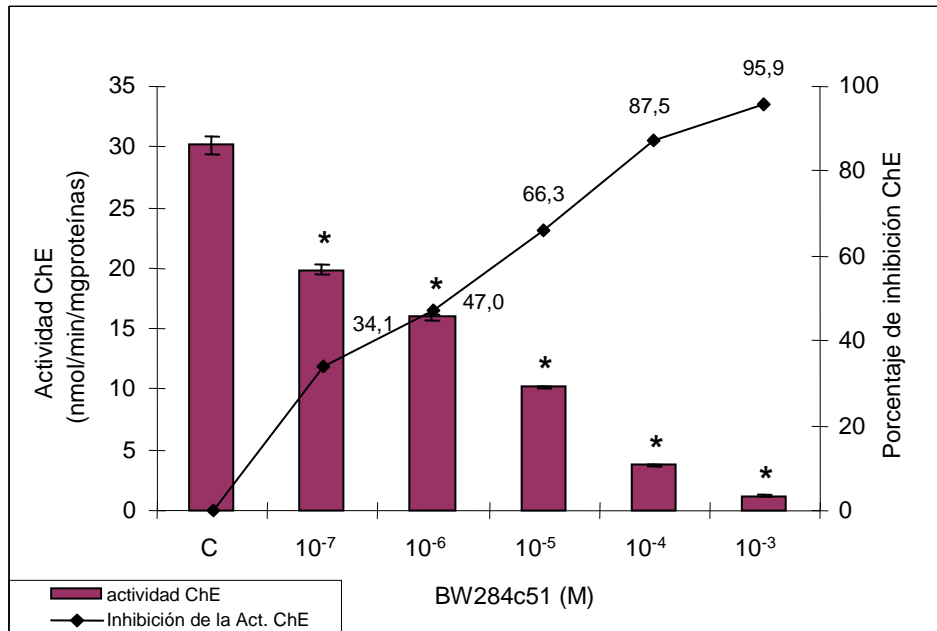


Figura 4.21. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando ASCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

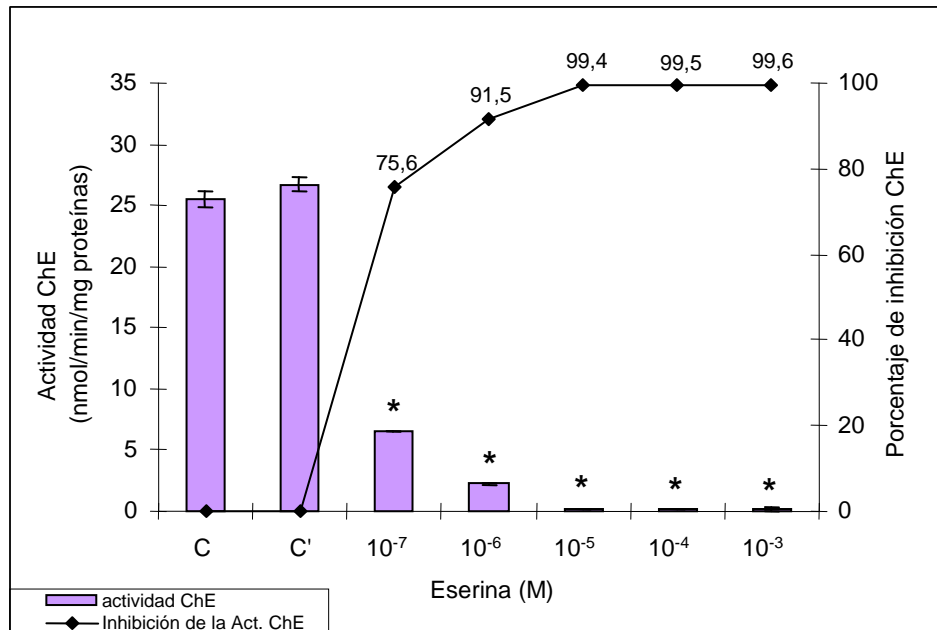


Figura 4.22. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando AβMSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MeOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

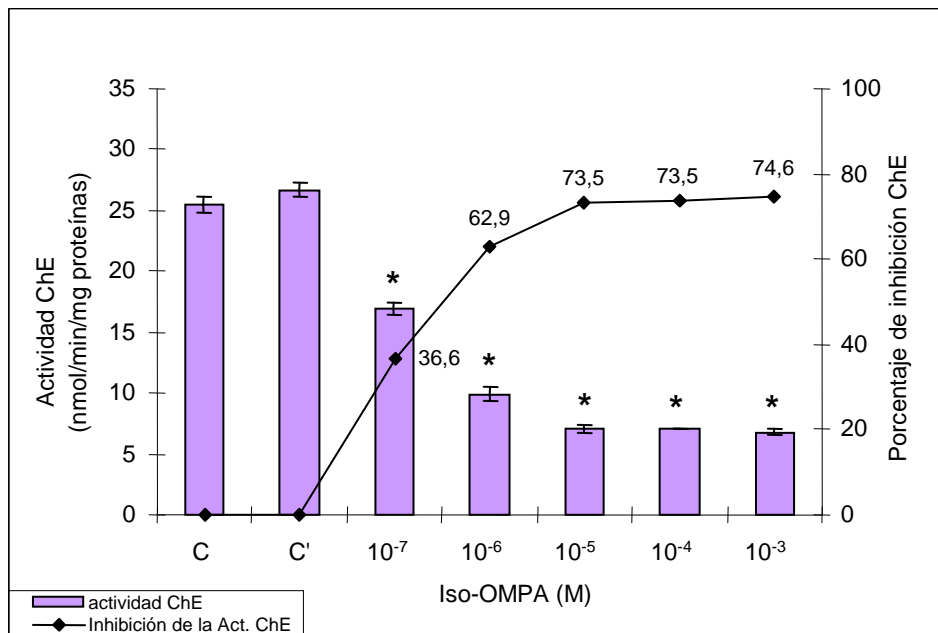


Figura 4.23. Efecto del inhibidor iso-OMPA sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando A β MSCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas con respecto a C' ($p < 0,05$).

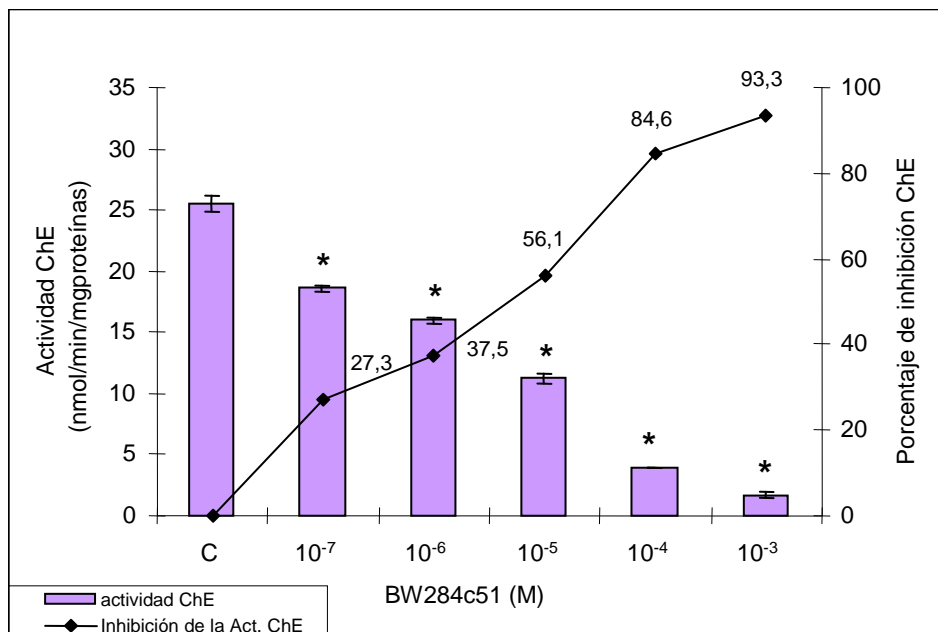


Figura 4.24. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando A β MSCh (1,07 mM). C = Control Agua milli; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

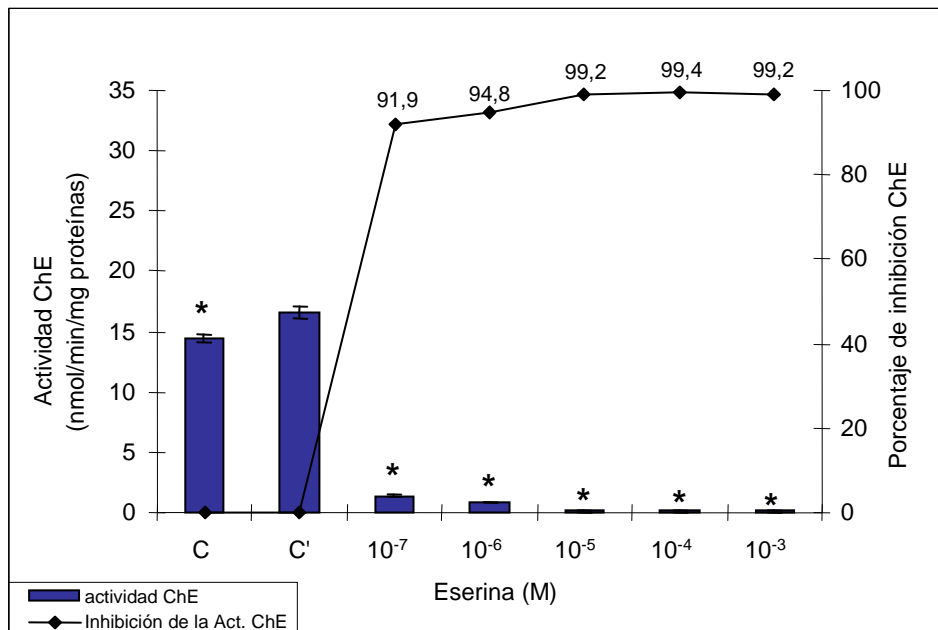


Figura 4.25. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad colinesterasa en músculo de *Sparus aurata*, utilizando BSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

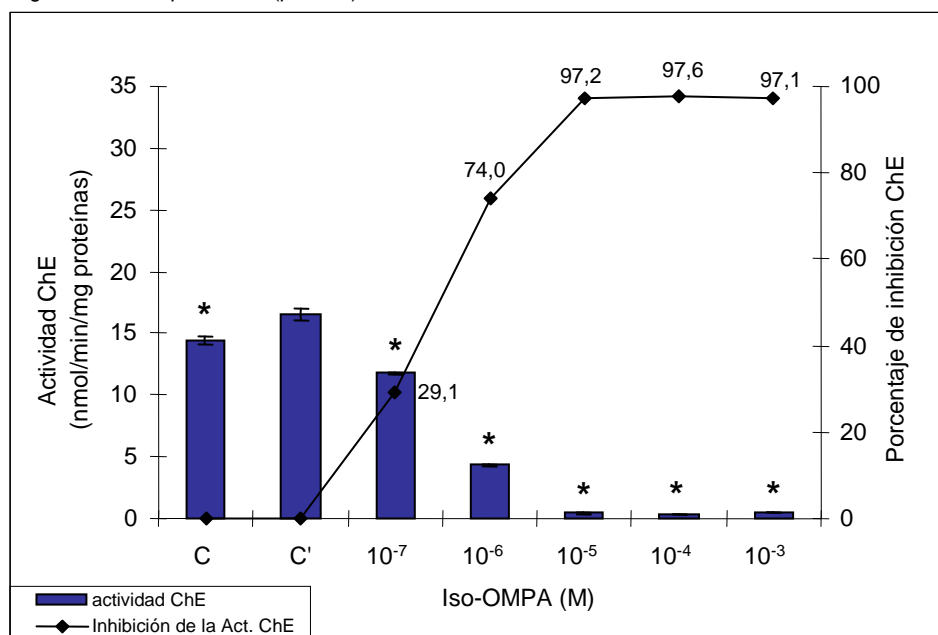


Figura 4.26. Efecto del inhibidor iso-OMPA sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando BSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

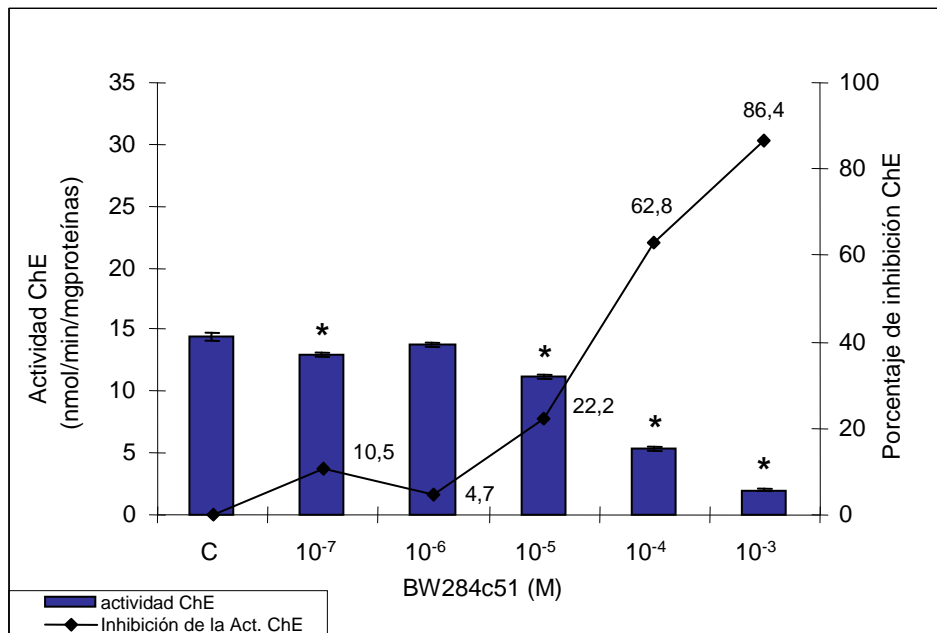


Figura 4.27. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando BSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

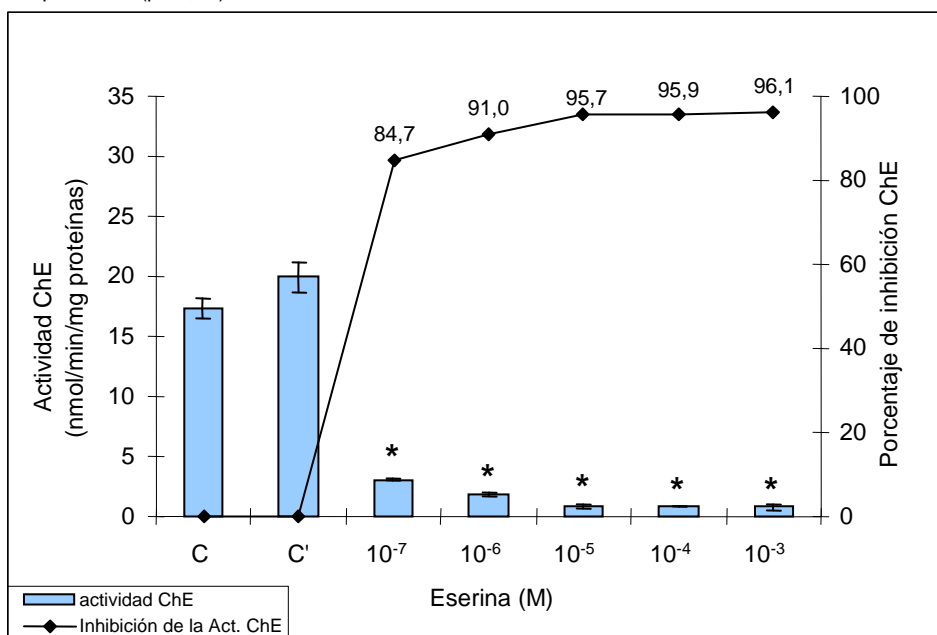


Figura 4.28. Efecto del inhibidor eserina sobre la actividad colinesterasa en músculo de *Sparus aurata*, utilizando PSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MeOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

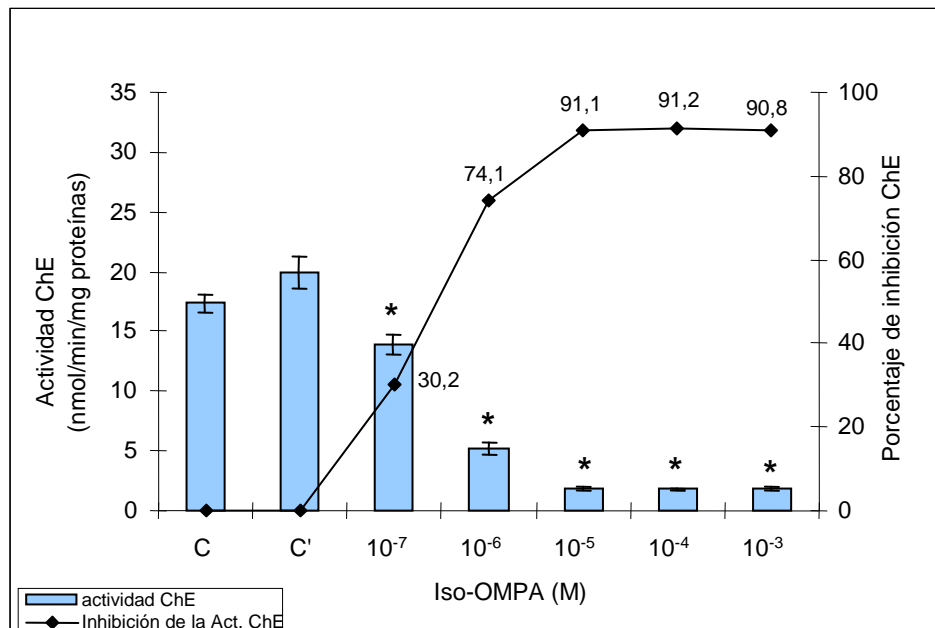


Figura 4.29. Efecto del iso-OMPA sobre la actividad ChE muscular en *Sparus aurata*, utilizando PSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; C' = Control MEtOH; * = diferencias significativas respecto a C' ($p < 0,05$).

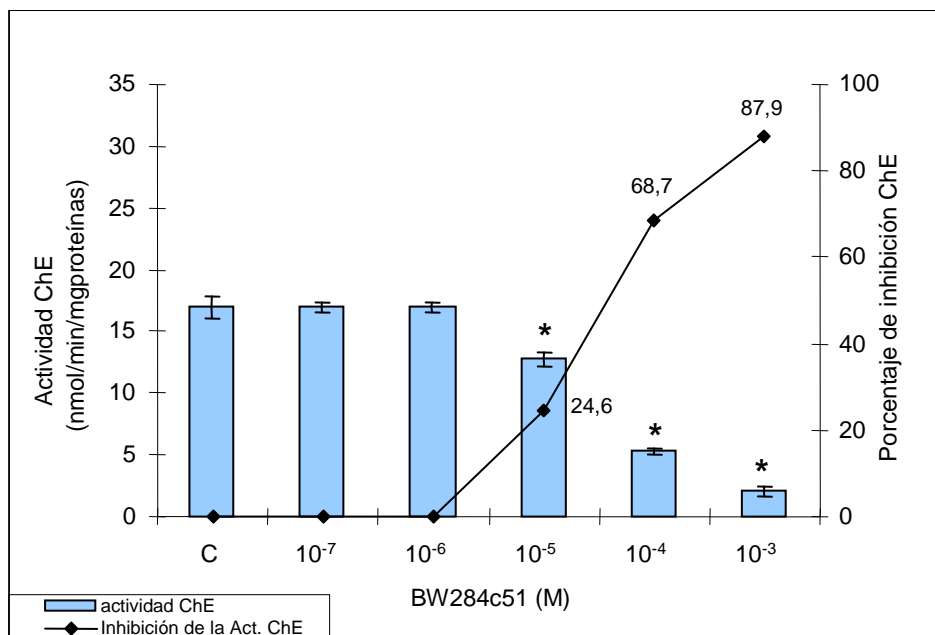


Figura 4.30. Efecto del inhibidor BW284c51 sobre la actividad ChE en músculo de *Sparus aurata*, utilizando PSCh (1,07 mM). C = Control Agua milliq; * = diferencias significativas respecto a C ($p < 0,05$).

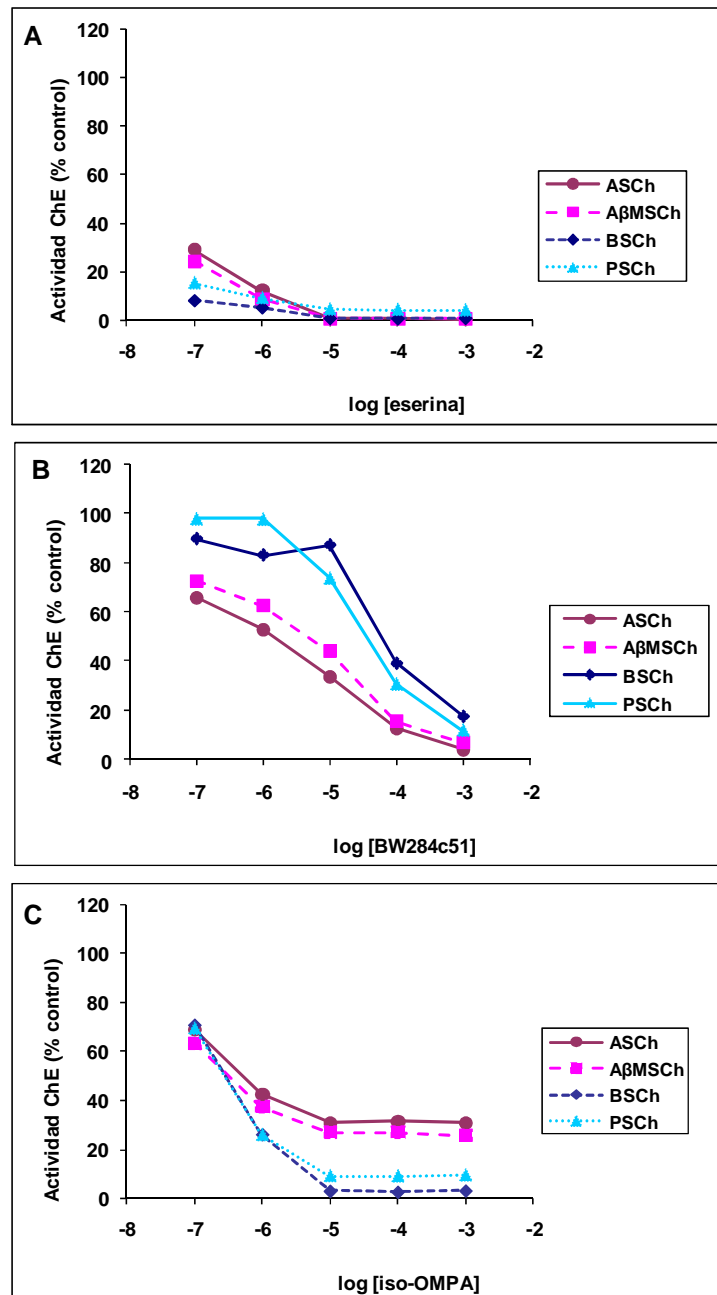


Figura 4.31. Resumen de los efectos *in vitro* de diversos inhibidores específicos sobre la actividad colinesterasa (ChE) muscular en *Sparus aurata*: (A) eserina, (B) BW284c51 y (C) iso-OMPA (concentración en M). Los valores representan la actividad residual sobre diferentes sustratos (ASCh, AβMSCh, BSCh, PSCh) tras 30 min de incubación con el inhibidor. Los símbolos representan los valores medios de tres determinaciones.

4. 2. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BASAL Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

Los valores medios de los diversos parámetros morfométricos estudiados se encuentran en la Tabla 4.4. La longitud corporal de los peces estudiados se encontraba en el rango de 13,5 y 32,0 cm, mientras que el peso osciló entre 28,4 y 442,6 g. La actividad colinesterasa varió entre 37,7 y 432,6 nmol/min/mg proteínas (AChE en cerebro), entre 38,3 y 63,4 nmol/min/mg proteínas (AChE en músculo) y entre 15,9 y 59,5 nmol/min/mg proteínas (BChE en músculo).

En las Figuras 4.32-4.39 se encuentran representados los diagramas de dispersión de la actividad colinesterasa (AChE en cerebro y BChE y AChE en músculo) frente a la edad y diferentes parámetros morfométricos (longitud total, peso corporal, peso cerebro, peso hígado, índice somático cerebral, índice somático hígado y factor de condición) de los 60 ejemplares de dorada estudiados. Los estadísticos de la regresión lineal simple se muestran en la Tabla 4.5.

El análisis de correlación mostró una correlación negativa significativa ($p < 0,05$) entre la AChE cerebral y la longitud ($r = -0,3016$) y el peso del cerebro ($r = -0,2879$). La AChE muscular tuvo una correlación significativa negativa con la edad ($r = -0,7265$), la longitud ($r = -0,8797$), el peso ($r = -0,8310$), el peso del cerebro ($r = -0,8399$) y el peso de hígado ($r = -0,6603$). La BChE estuvo correlacionada negativamente de forma significativa con la edad ($r = -0,3383$), la longitud ($r = -0,3746$), el peso ($r = -0,3646$) y el peso del cerebro ($r = -0,3075$). Tanto la actividad colinesterasa cerebral (AChE) como la actividad colinesterasa muscular (AChE y BChE) mostraron una correlación positiva significativa con el índice somático cerebral, con coeficientes de correlación de 0,3421, 0,8974 y 0,3746, respectivamente. El resto de los coeficientes de correlación no fueron significativos. Los coeficientes de determinación fueron bajos ($< 0,15$) excepto para la relación entre la AChE muscular y la edad, longitud, peso, peso del cerebro, peso del hígado e índice somático cerebral (0,53-0,80).

En las Figuras 4.40-4.47 se recogen los diagramas log-log de la actividad colinesterasa frente a la edad y los diversos factores morfométricos estudiados. En la Tabla 4.6 se presentan los diferentes parámetros de regresión y correlación para cada par de variables estudiadas. Al aplicar el modelo potencial, la actividad colinesterasa presentó una relación estadísticamente significativa con un mayor número de variables

morfométricas, aumentando en la mayoría de los casos el coeficiente de determinación. Teniendo en cuenta que el coeficiente de determinación (R^2) indica la proporción de variabilidad total de la variable dependiente explicada por el modelo de regresión, se comprobó que en la mayoría de los casos el modelo potencial explicaba la variabilidad de la actividad colinesterasa mejor que el modelo lineal simple. Se puede observar que los coeficientes de determinación más altos correspondieron también en este caso a la actividad AChE, obteniéndose valores de 0,75 o más con las siguientes variables: edad, longitud, peso, peso cerebral, peso hepático e índice somático cerebral. El análisis estadístico indicó que la correlación fue altamente significativa, con $p < 0,0001$. Los factores que presentaron un mayor grado de asociación con la actividad AChE muscular (correlación negativa) fueron la longitud y el peso corporal, encontrándose coeficientes de determinación de 0,8254 y 0,8541, respectivamente. Es decir, la longitud y el peso corporal son variables que explican un 83% y un 85% de la actividad AChE muscular, respectivamente. Sin embargo, los resultados señalaron una correlación negativa altamente significativa ($p < 0,01$) pero relativamente débil entre estas variables morfométricas y la actividad AChE cerebral y BChE muscular, ya que ninguna de ellas explicaba más de un 18% de la actividad. Por el contrario, no se obtuvo una correlación estadísticamente significativa entre los siguientes pares de variables: AChE cerebral-edad, AChE cerebral-índice somático hepático, AChE cerebral-factor de condición, AChE muscular-factor de condición, BChE muscular-índice somático hepático y BChE muscular-factor de condición.

Tabla 4.4. Resumen de los valores medios y eem de los factores morfométricos estudiados (edad, longitud, peso corporal, peso cerebral, peso hepático, factor de condición, índice hepatosomático, índice organosomático del cerebro) y de la actividad colinesterasa* en cerebro y músculo de *Sparus aurata*.

Edad	Longitud (cm)	Peso (g)	Peso Cerebro (g)	Peso hígado (g)	Índice somático cerebral	Índice hepato-somático	Factor de condición	Actividad AChE cerebral	Actividad AChE muscular	Actividad BChE muscular
48	14,15±0,29	42,73±3,88	190,56±10,84	0,52±0,08	0,46±0,06	1,22±0,14	302,42±29,18	361,47±28,06	48,00±7,20	35,32±3,71
60	18,21±0,67	92,73±8,63	275,94±14,32	1,15±0,15	0,30±0,02	1,24±0,07	507,9±32,23	316,54±14,85	32,98±4,38	24,00±3,15
72	21,45±1,33	150,4±25,96	346,61±33,82	1,70±0,25	0,25±0,05	1,08±0,04	690,72±82,88	264,82±15,30	24,11±3,80	35,14±9,70
84	24,35±0,78	230,01±29,74	466,11±28,27	2,79±0,54	0,21±0,02	1,19±0,11	937,68±94,77	274,0±25,0	17,16±2,54	29,25±3,86
96	25,75±1,26	276,84±40,64	471,52±35,32	3,25±0,60	0,18±0,02	1,17±0,12	1062,50±117,86	335,57±20,81	16,47±3,38	22,62±3,84
152	28,95±0,97	380,74±24,75	581,80±22,50	3,40±0,46	0,15±0,01	0,89±0,10	1313,05±60,42	304,08±31,14	10,67±1,14	22,28±4,75

* Media ± eem

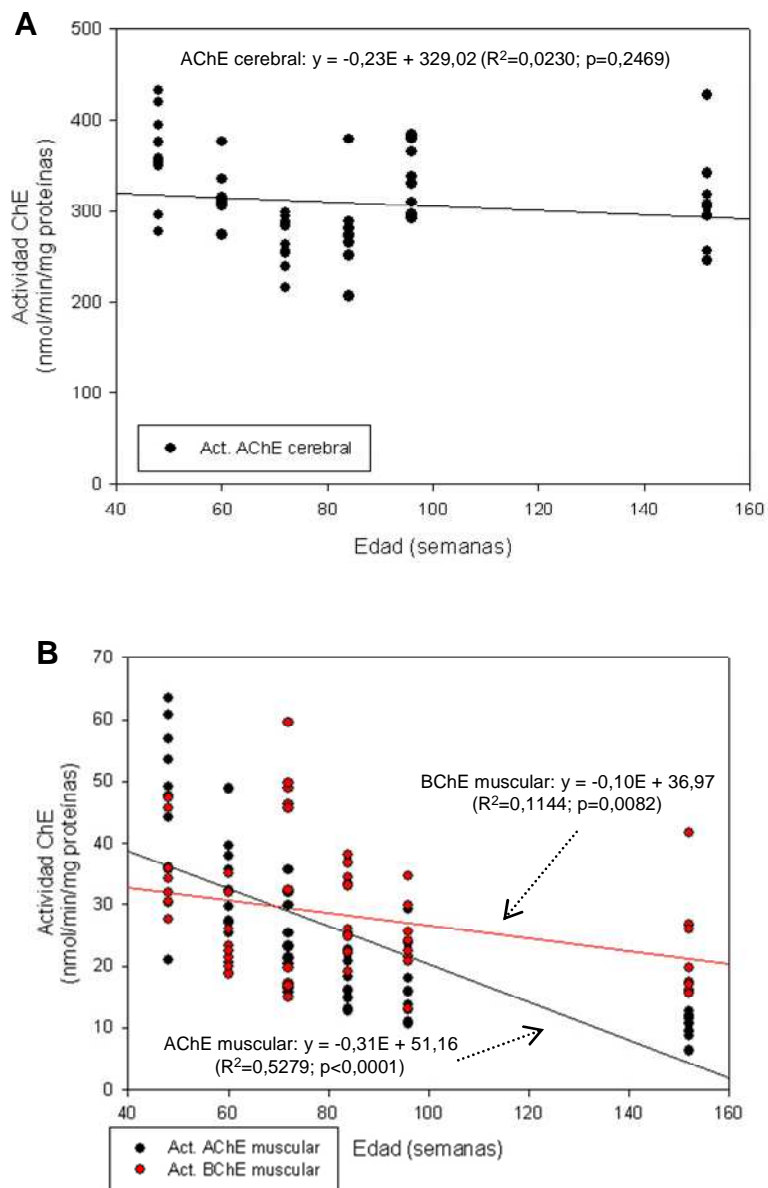


Figura 4.32. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente a la edad en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

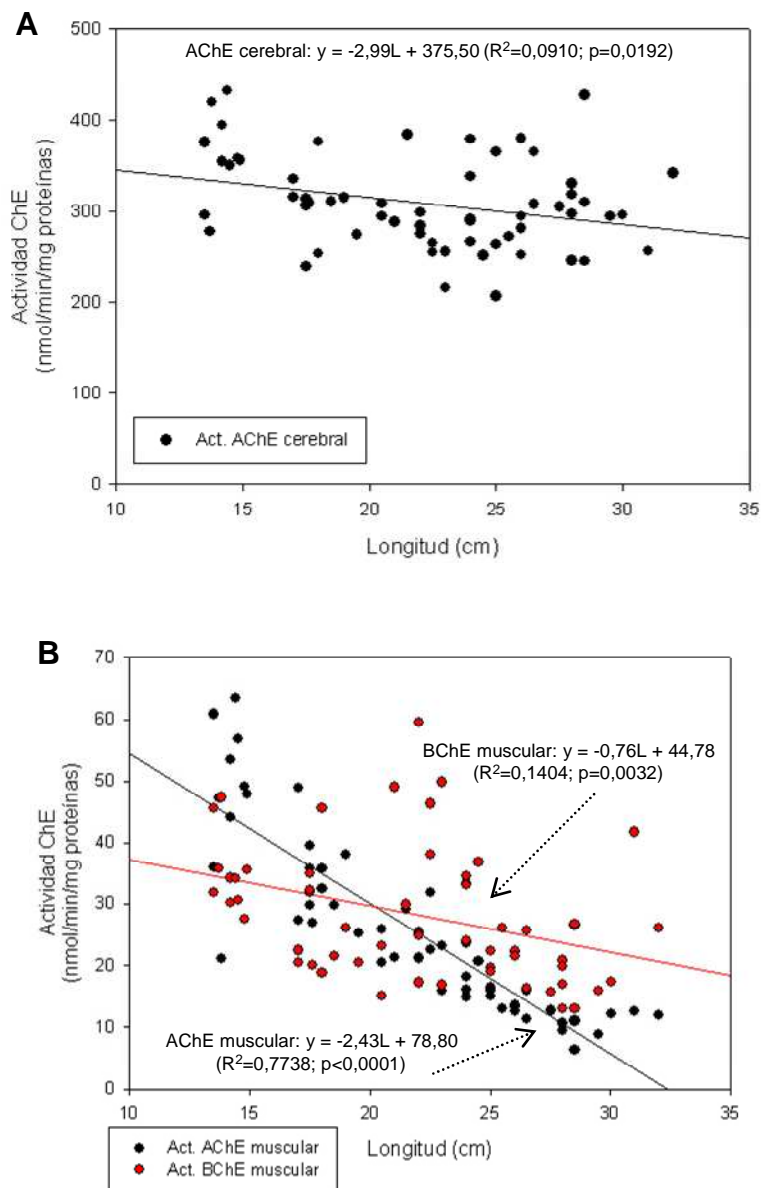


Figura 4.33. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente a la longitud corporal en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

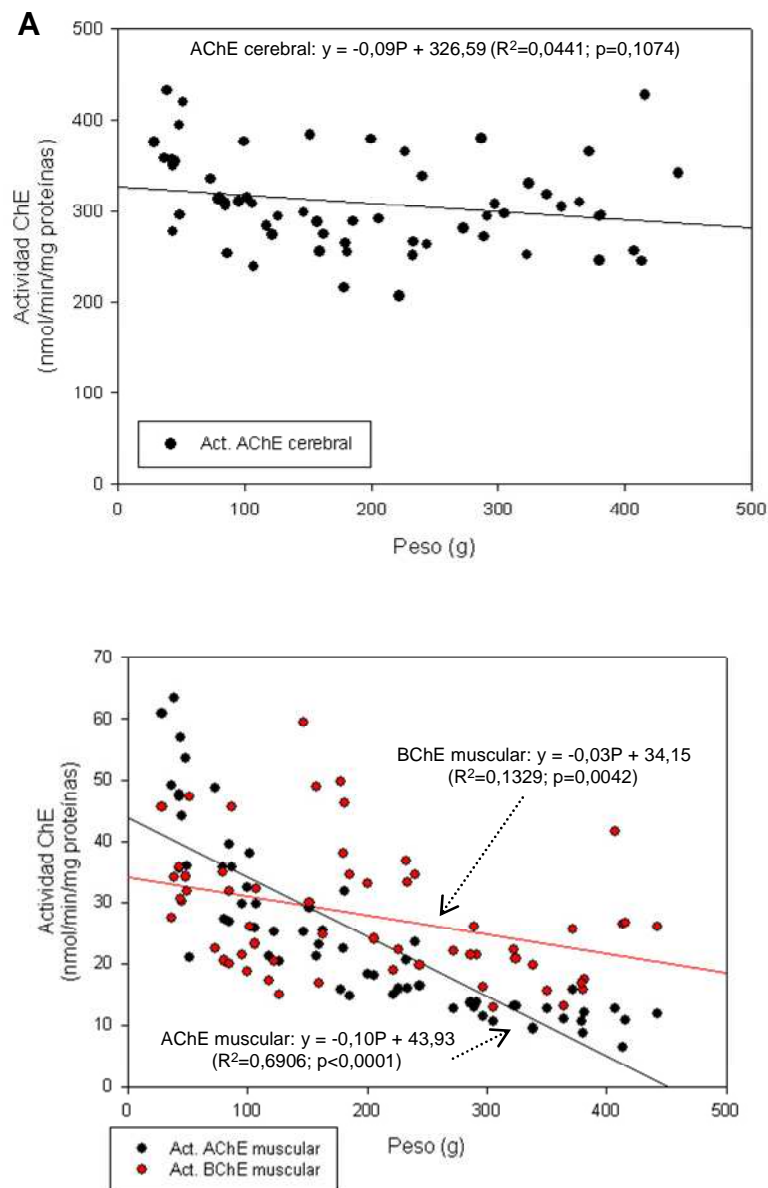


Figura 4.34. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente al peso corporal en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

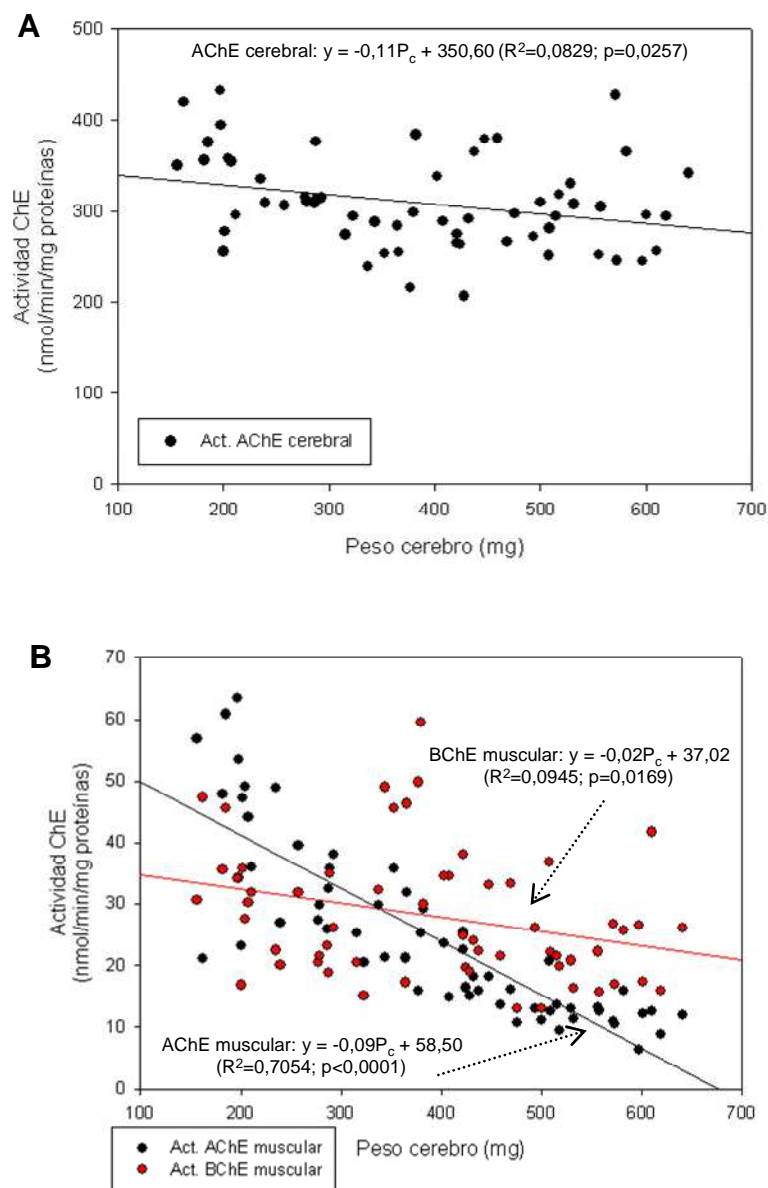


Figura 4.35. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente al peso cerebral en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

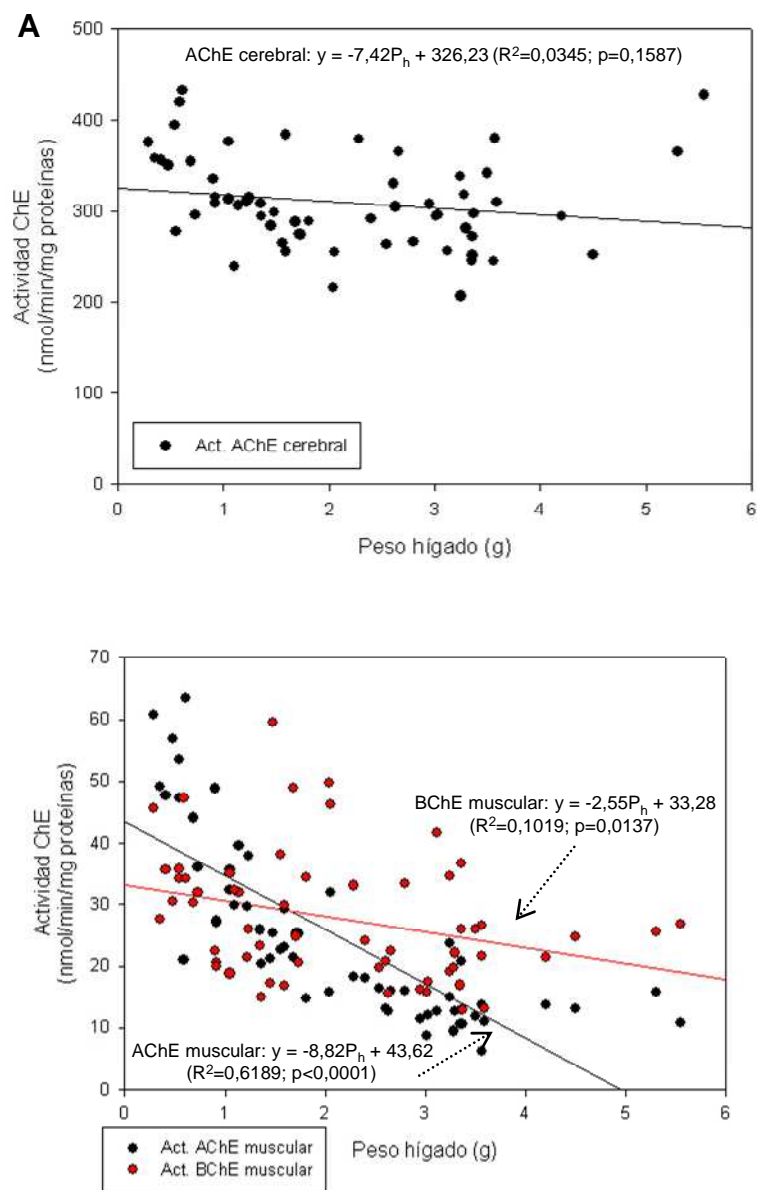


Figura 4.36. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente al peso hepático en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

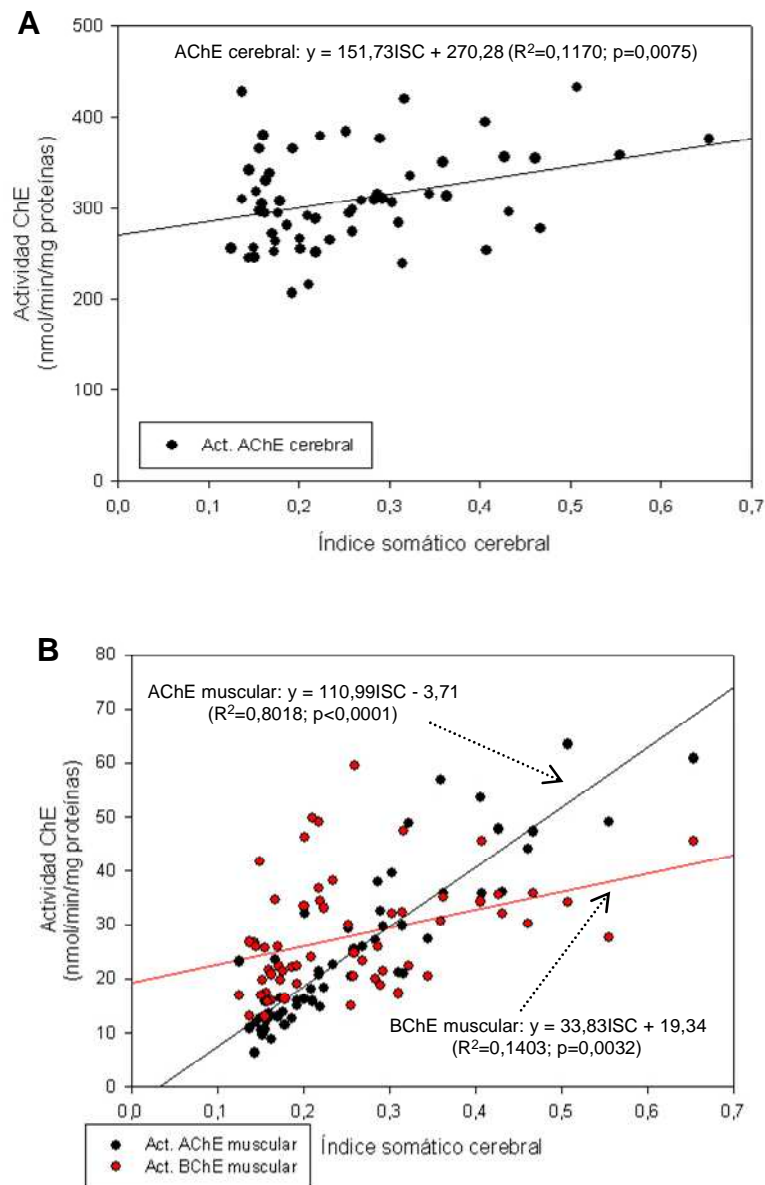


Figura 4.37. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente al índice somático cerebral en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

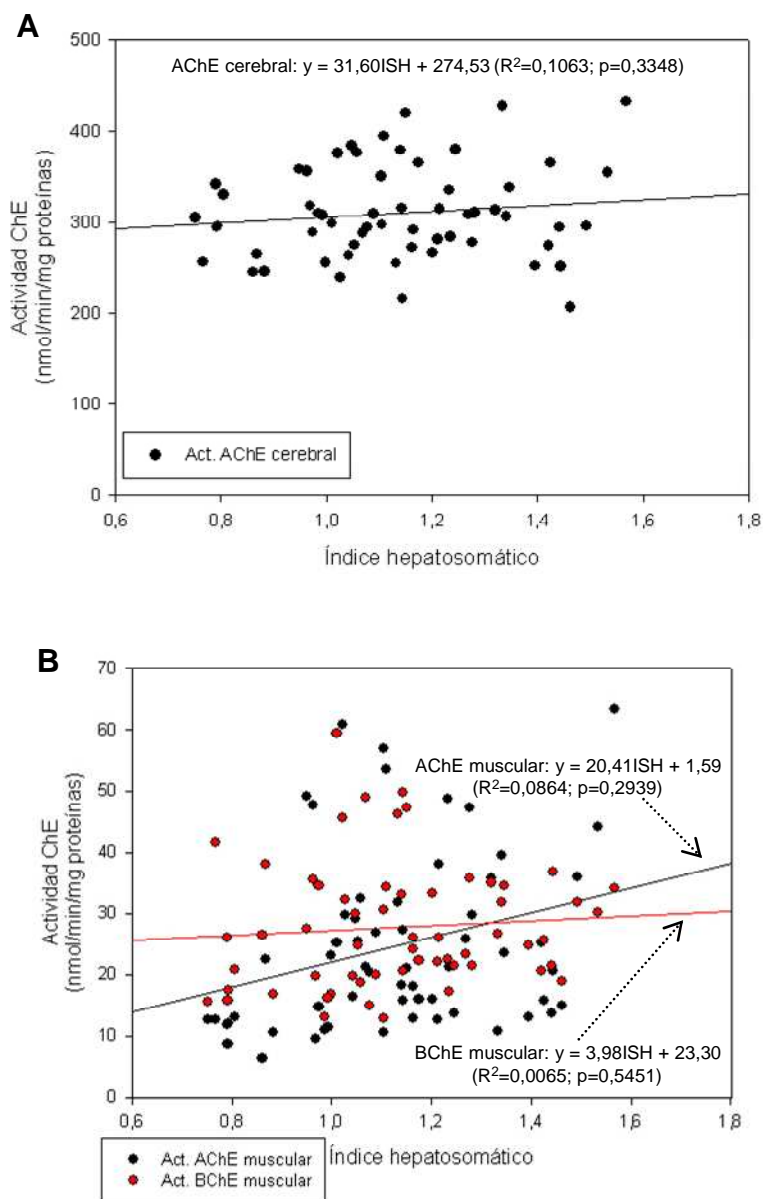


Figura 4.38. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente al índice hepatosomático en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

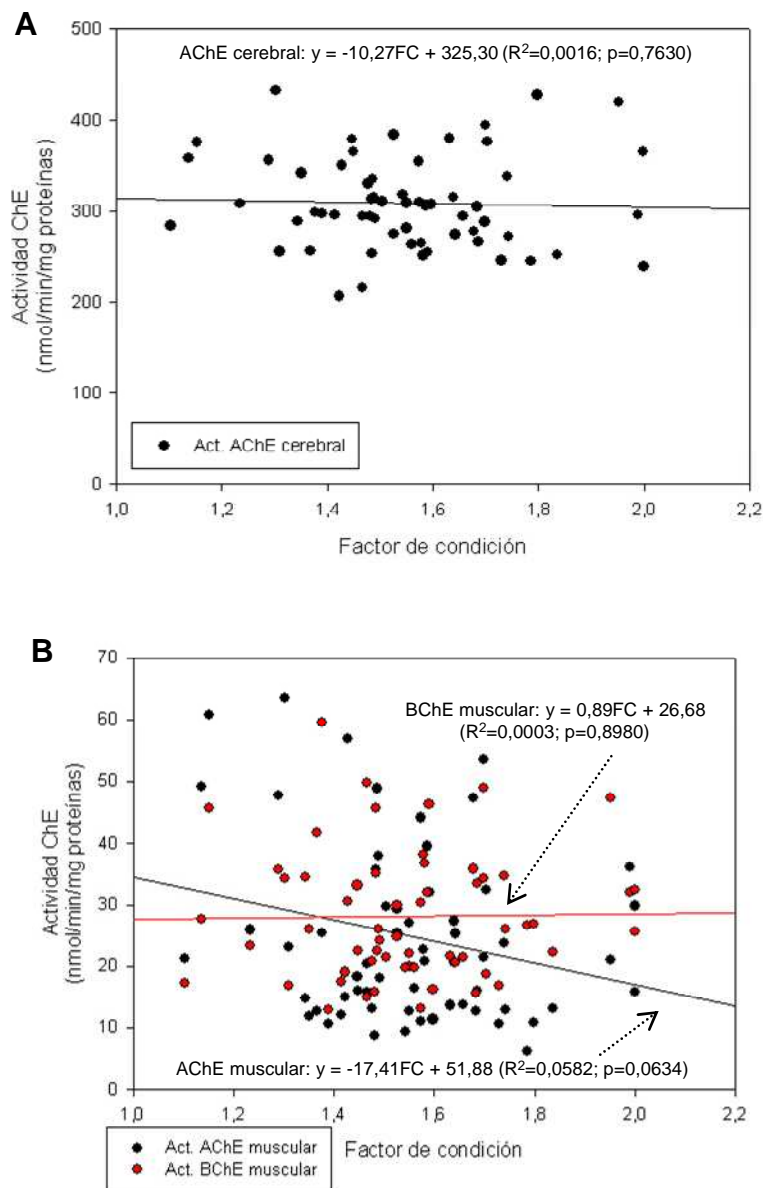


Figura 4.39. Diagrama de dispersión y recta de ajuste de la actividad colinesterasa cerebral (A) y muscular (B) frente al factor de condición en *Sparus aurata*. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

Tabla 4.5. Análisis de relación lineal ($y= ax+b$) entre la actividad colinesterasa (nmol/min/mg proteínas) en tejido cerebral y muscular y diferentes parámetros morfométricos en *Sparus aurata*.

ChE	Factor	N	a	b	r	R ²	p	S/ NS
AChE cerebral	Edad	60	-0,2301	329,02	-0,1518	0,0230	0,2469	NS
	Longitud	60	-2,9857	375,50	-0,3016	0,0910	0,0192	S
	Peso	60	-0,0880	326,59	-0,2100	0,0441	0,1074	NS
	Peso cerebro	60	-0,1060	350,60	-0,2879	0,0829	0,0257	S
	Peso hígado	60	-7,42	326,23	-0,1859	0,0345	0,1587	NS
	Índice somático cerebral	60	151,73	270,28	0,3421	0,1170	0,0075	S
	Índice somático hígado	60	31,60	274,53	0,1278	0,1063	0,3348	NS
	Factor de condición	60	-10,27	325,30	-0,0397	0,0016	0,7630	NS
AChE muscular	Edad	60	-0,3078	51,16	-0,7265	0,5279	<0,0001	S
	Longitud	60	-2,4340	78,80	-0,8797	0,7738	<0,0001	S
	Peso	60	-0,0973	43,93	-0,8310	0,6906	<0,0001	S
	Peso cerebro	60	-0,0864	58,50	-0,8399	0,7054	<0,0001	S
	Peso hígado	60	-8,82	43,62	-0,7867	0,6189	<0,0001	S
	Índice somático cerebral	60	110,99	-3,71	0,8954	0,8018	<0,0001	S
	Índice somático hígado	60	20,41	1,59	0,2939	0,0864	0,2939	NS
	Factor de condición	60	-17,41	51,88	-0,2412	0,0582	0,0634	NS
BChE muscular	Edad	60	-0,1044	36,97	-0,3383	0,1144	0,0082	S
	Longitud	60	-0,7550	44,78	-0,3746	0,1404	0,0032	S
	Peso	60	-0,0311	34,15	-0,3646	0,1329	0,0042	S
	Peso cerebro	60	-0,0231	37,02	-0,3075	0,0945	0,0169	S
	Peso hígado	60	-2,55	33,28	-0,3192	0,1019	0,0137	S
	Índice somático cerebral	60	33,83	19,34	0,3746	0,1403	0,0032	S
	Índice somático hígado	60	3,98	23,30	0,0804	0,0065	0,5451	NS
	Factor de condición	60	0,8892	26,68	0,0169	0,0003	0,8980	NS

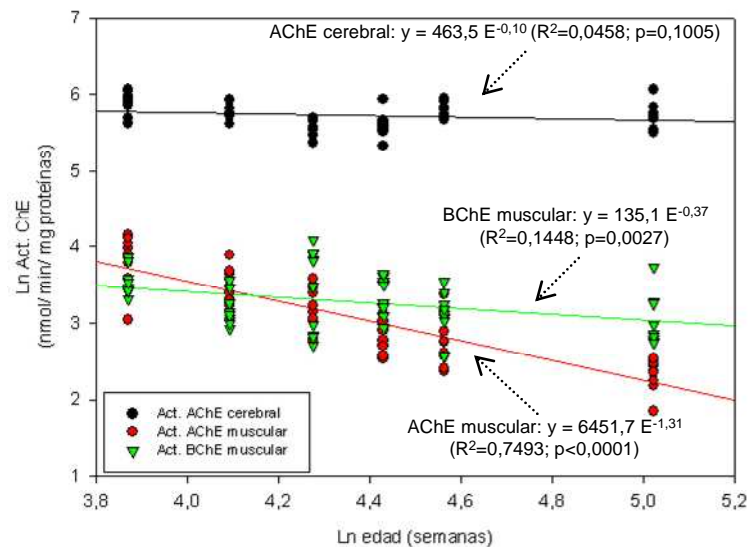


Figura 4.40. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. edad en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

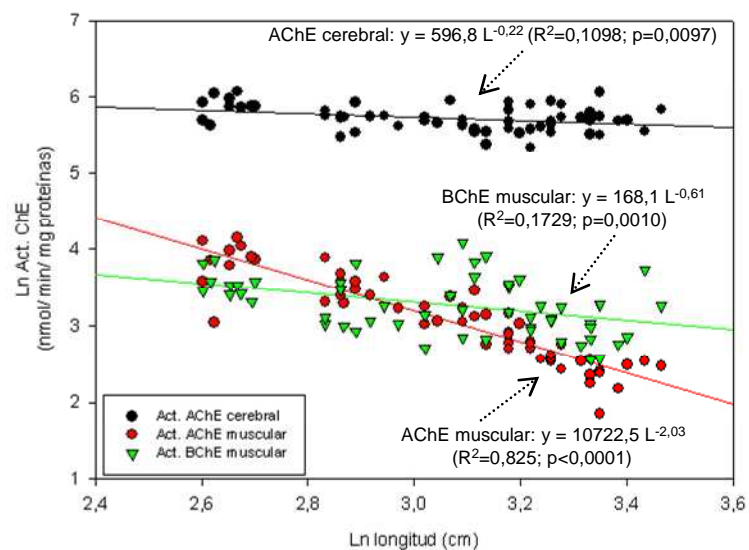


Figura 4.41. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. longitud corporal en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

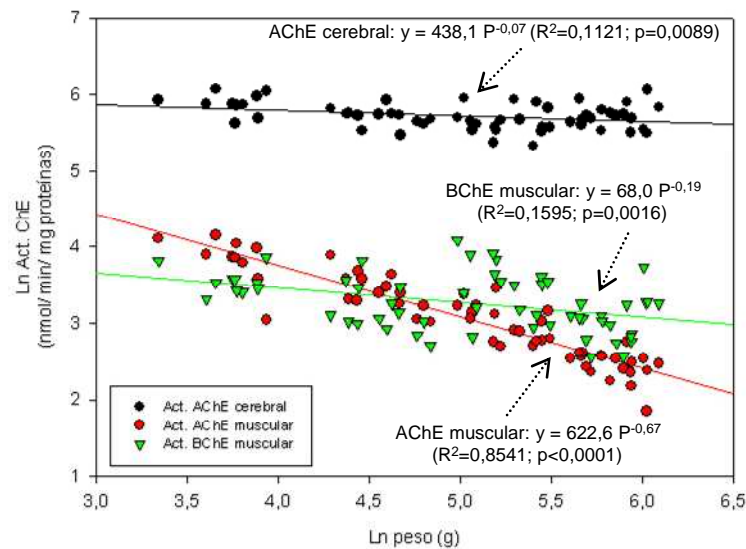


Figura 4.42. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. peso corporal en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

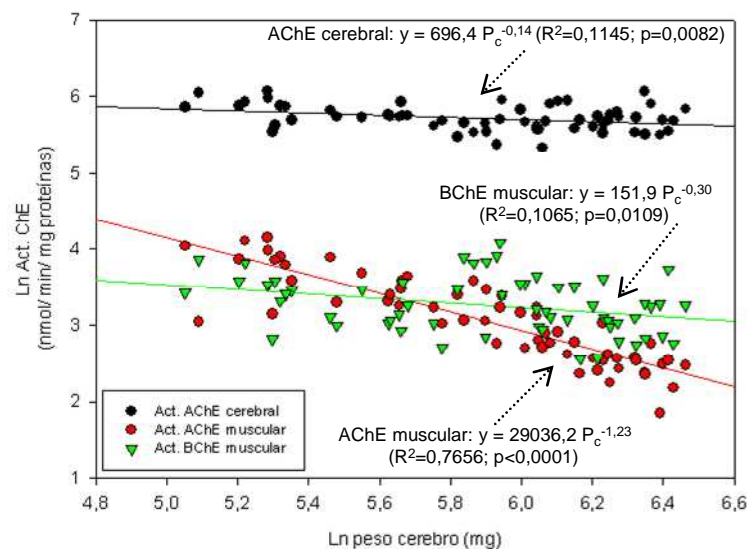


Figura 4.43. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. peso cerebral en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

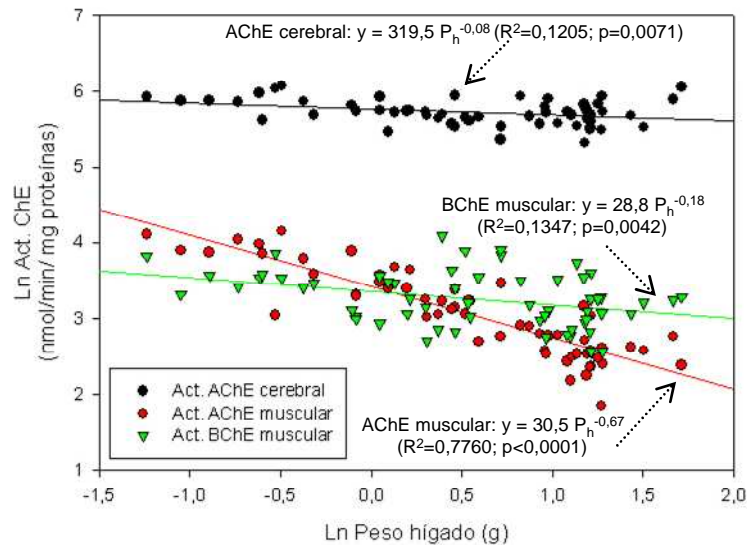


Figura 4.44. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. peso hepático en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

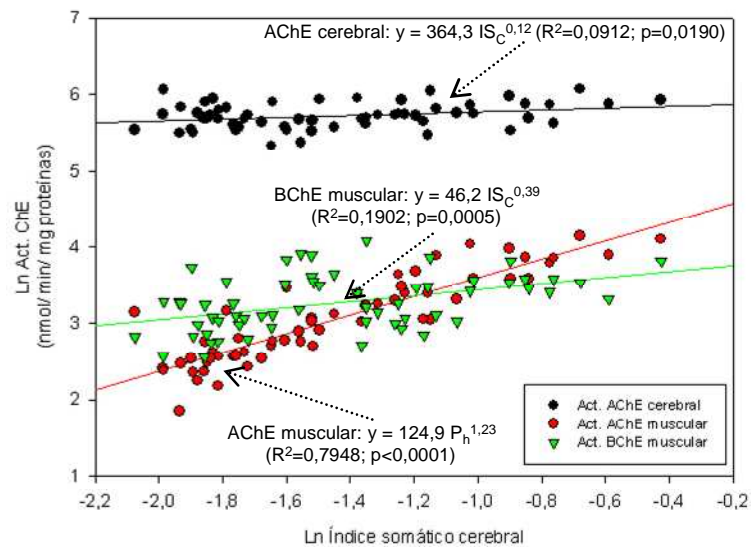


Figura 4.45. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. índice somático cerebral en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

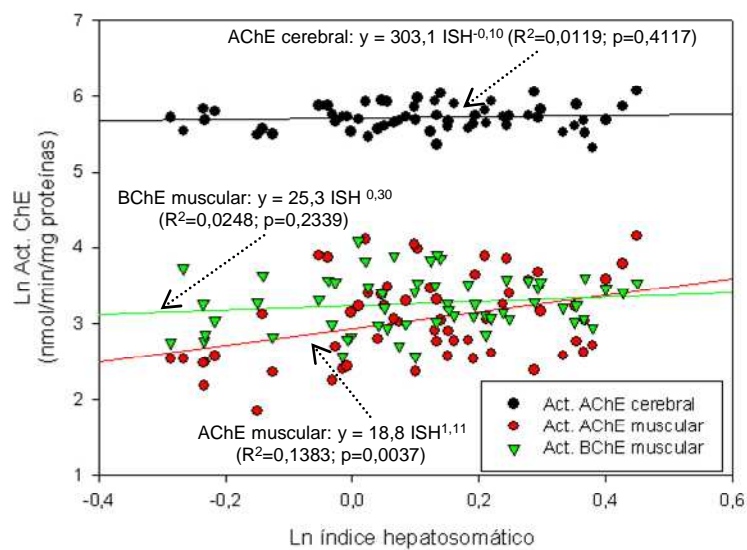


Figura 4.46. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. índice hepatosómico en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

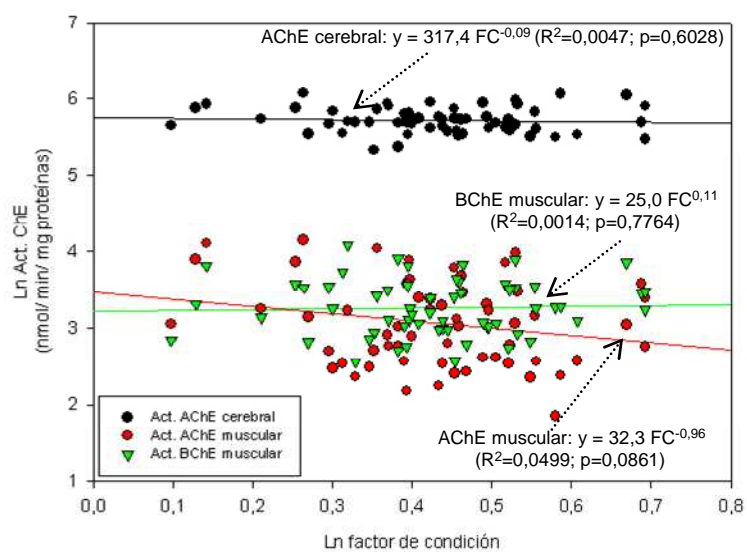


Figura 4.47. Diagrama log-log de la actividad colinesterasa vs. factor de condición en *Sparus aurata* y recta de ajuste. Se han insertado las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de determinación (R^2) y los correspondientes niveles de significación (p).

Tabla 4.6. Análisis de la relación potencial ($y = ax^b$) entre la actividad colinesterasa (nmol/min/mg proteínas) en tejido cerebral y muscular y diferentes parámetros morfométricos en *Sparus aurata*.

ChE	Factor	N	b	Ln a	r	R ²	p	S/ NS
AChE cerebral	Edad	60	-0,0954	6,1387	-0,2141	0,0458	0,1005	NS
	Longitud	60	-0,2185	6,3916	-0,3313	0,1098	0,0097	S
	Peso	60	-0,0718	6,0824	-0,3349	0,1121	0,0089	S
	Peso cerebro	60	-0,1400	6,5459	-0,3384	0,1145	0,0082	S
	Peso hígado	60	-0,0782	5,7668	-0,3471	0,1205	0,0071	S
	ISC	60	0,1227	5,8981	0,3020	0,0912	0,0190	S
	ISH	60	0,0953	5,7141	0,1089	0,0119	0,4117	NS
	Factor de condición	60	-0,0869	5,7586	-0,0686	0,0047	0,6028	NS
AChE muscular	Edad	60	-1,3047	8,7721	-0,8656	0,7493	<0,0001	S
	Longitud	60	-2,0266	9,2801	-0,9085	0,8254	<0,0001	S
	Peso	60	-0,6705	6,4339	-0,9242	0,8541	<0,0001	S
	Peso cerebro	60	-1,2247	10,2763	-0,8750	0,7656	<0,0001	S
	Peso hígado	60	-0,6740	3,4184	-0,8809	0,7760	<0,0001	S
	ISC	60	1,2251	4,8274	0,8915	0,7948	<0,0001	S
	ISH	60	1,1052	2,9337	0,3719	0,1383	0,0037	S
	Factor de condición	60	-0,9581	3,4735	-0,2235	0,0499	0,0861	NS
BChE muscular	Edad	60	-0,3733	4,9051	-0,3806	0,1448	0,0027	S
	Longitud	60	-0,6047	5,1248	-0,4158	0,1729	0,0010	S
	Peso	60	-0,1889	4,2193	-0,3994	0,1595	0,0016	S
	Peso cerebro	60	-0,2977	5,0233	-0,3263	0,1065	0,0109	S
	Peso hígado	60	-0,1804	3,3596	-0,3670	0,1347	0,0042	S
	ISC	60	0,3906	3,8322	0,4361	0,1902	0,0005	S
	ISH	60	0,3005	3,2294	0,1574	0,0248	0,2339	NS
	Factor de condición	60	0,1047	3,2244	0,0374	0,0014	0,7764	NS

4. 3. ENSAYOS DE INHIBICIÓN CON INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

4. 3. 1. ENSAYOS *in vitro*

En las Figuras 4.47 a 4.58 se presentan un conjunto de resultados representativos de los ensayos de inhibición *in vitro* de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de la dorada para azinfosmetil-oxón (Figuras 4.47-4.49), diclorvos (Figuras 4.50-4.52), ometoato (Figuras 4.53-4.55) y paraoxón (Figuras 4.56-4.58). En la parte superior de estas figuras se observa la evolución de la actividad residual ($\ln [E_t]/[E_o]$) en función del tiempo de incubación (gráficos primarios). De la regresión lineal por mínimos cuadrados de los datos para cada concentración de inhibidor se obtuvo una línea de ajuste de pendiente $-k_{ap}$, con coeficientes de determinación entre 0,90 y 0,99. Al aumentar la concentración del organofosforado, la pendiente negativa aumentaba en valor absoluto, obteniéndose valores de k_{ap} más elevados. La actividad residual $[E_t]$ en todos los casos se encontraba en un rango de entre el 10 y el 90% de la actividad inicial $[E_o]$ a tiempos de incubación entre 0 y 5 min. En la parte inferior de las figuras se encuentran la representaciones dobles recíprocas de los valores k_{ap} frente a la concentración de inhibidor (gráficos secundarios); a partir de ellas y por regresión lineal se obtuvieron las constantes cinéticas de inhibición para cada compuesto y los valores estimados de CI_{50} , cuyos valores medios se reflejan en la Tabla 4.7. Los coeficientes de determinación de dichas rectas de ajuste, se encontraban para los cuatro compuestos entre los valores de 0,90 y 0,99. Estos datos sugieren que la inhibición de las enzimas colinesterasas en *Sparus aurata* sigue una cinética de Michaelis-Menten de pseudo-primer orden. No fue posible calcular las constantes de inhibición k_p y K_d para la inhibición de la BChE muscular por diclorvos y paraoxón debido a que el y-intercepto fue negativo. En estos casos, la recta de ajuste de la gráfica doble recíproca de $1/k_{ap}$ en función de $1/[I]$ se forzó a pasar por el origen de coordenadas y se estimó el valor de k_i a partir del valor inverso de la pendiente tal como describen Filho y col., 2004.

Los parámetros cinéticos (k_p , K_d , k_i , CI_{50}) de la inhibición de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de la dorada por los compuestos organofosforados estudiados se resumen en la Tabla 4.7. Los valores más bajos de la constante de disociación K_d (rango: 0,155-5837,1 μM) fueron los del compuesto azinfosmetil-oxón (0,656, 0,155 y 0,157 μM para AChE cerebral, AChE muscular y BChE muscular, respectivamente), indicando que este compuesto tiene la mayor afinidad de los cuatro

organofosforados estudiados por estas enzimas; sin embargo, la menor afinidad fue mostrada por el ometoato sobre la AChE cerebral ($K_d=5837,1 \mu\text{M}$). Por otra parte, los valores estimados para la velocidad de fosforilación (k_p) oscilaron en el rango de $0,326$ a $5,09 \text{ min}^{-1}$, siendo máxima para el ometoato sobre la AChE cerebral, velocidad unas 7 veces más rápida que la correspondiente al compuesto azinfosmetil-oxón ($0,717 \text{ min}^{-1}$). Los valores de la constante de inhibición bimolecular k_i (k_p/k_d), que indica la velocidad total de la reacción, determinados para la inhibición de las ChE por azinfosmetil-oxón, diclorvos, ometoato y paraoxón fueron de $1127,7$; $8,86$; $0,851$ y $10,9 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ para la AChE cerebral; de $2514,3$; $8,33$; $1,84$ y $21,7 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ para la AChE muscular; y de $2084,4$; $1,31 \times 10^5$; $122,3$ y $1,49 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ para la BChE muscular. Se comprobó que azinfosmetil-oxón es un inhibidor más potente de la AChE que paraoxón, diclorvos y ometoato, como indican su k_i más elevada y su K_d y CI_{50} más pequeña. Así, en la dorada, la k_i del azinfosmetil-oxón para la AChE cerebral es aproximadamente 100 veces superior a la del paraoxón, unas 130 veces superior a la del diclorvos y unas 1300 veces superior a la del ometoato. Por su parte, los valores de k_i para la AChE muscular revelaron una actividad inhibitoria del azinfosmetil-oxón aproximadamente unas 120, 300 y 1300 veces mayor que la del paraoxón, diclorvos y ometoato, respectivamente. Por otro lado, la BChE muscular resultó ser de 2 a 4 órdenes de magnitud más sensible que la AChE cerebral y muscular a los distintos inhibidores, a excepción del azinfosmetil-oxón, para el cual los valores de k_i estaban dentro del mismo orden de magnitud.

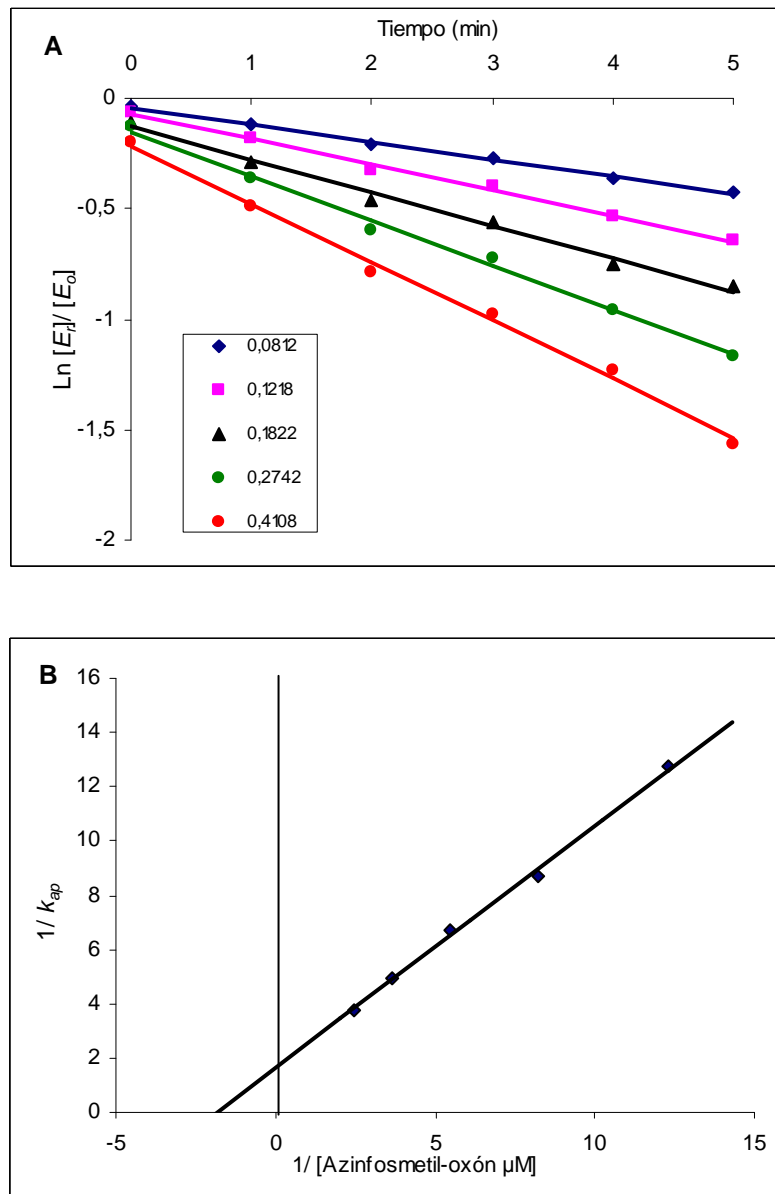


Figura 4.47. Cinética de la inhibición de la AChE cerebral de la dorada por azinofosmetil-oxón. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de azinofosmetil-oxón (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

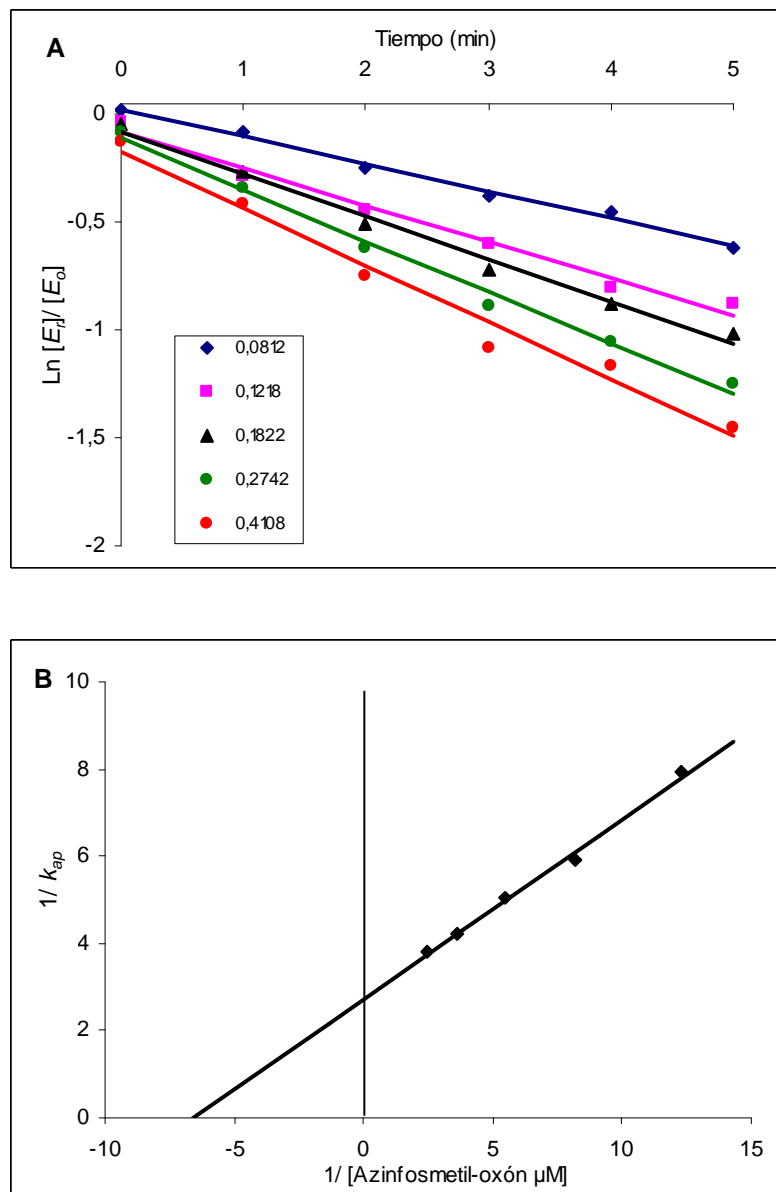


Figura 4.48. Cinética de la inhibición de la AChE muscular de la dorada por azinfosmetil-oxón. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de azinfosmetil-oxón (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

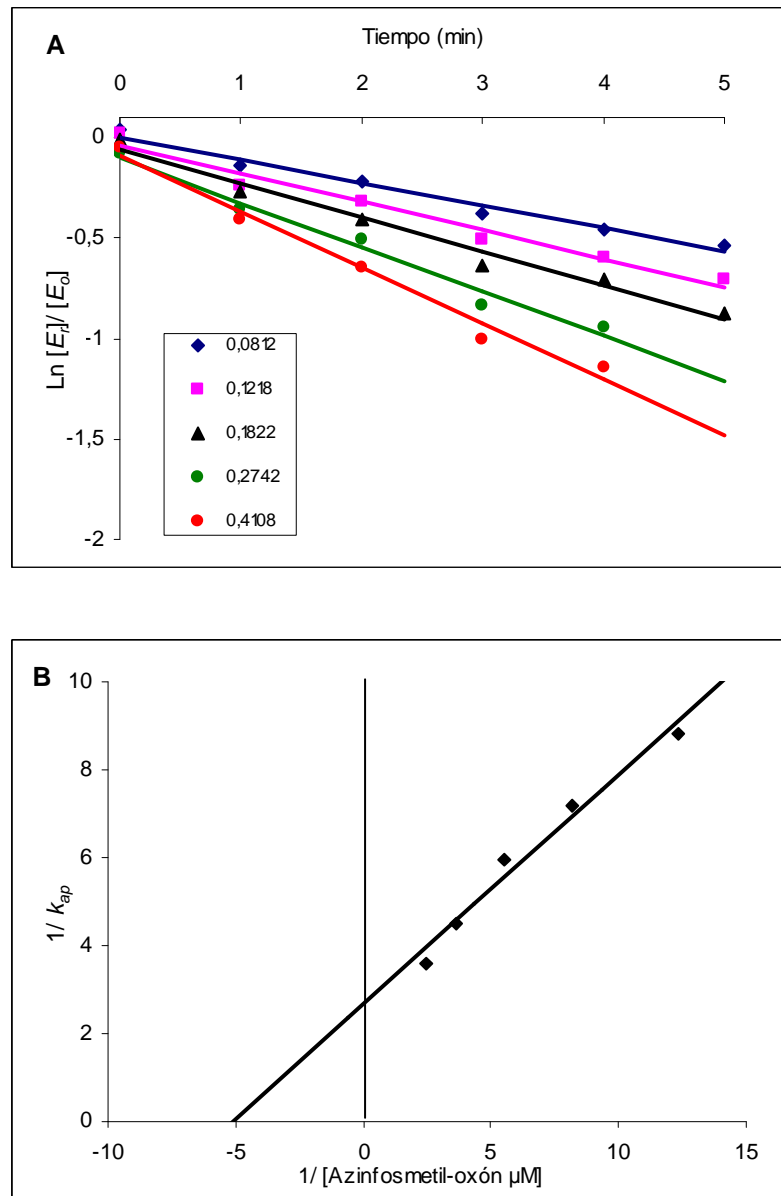


Figura 4.49. Cinética de la inhibición de la BChE muscular de la dorada por azinfosmetil-oxón. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de azinfosmetil-oxón (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

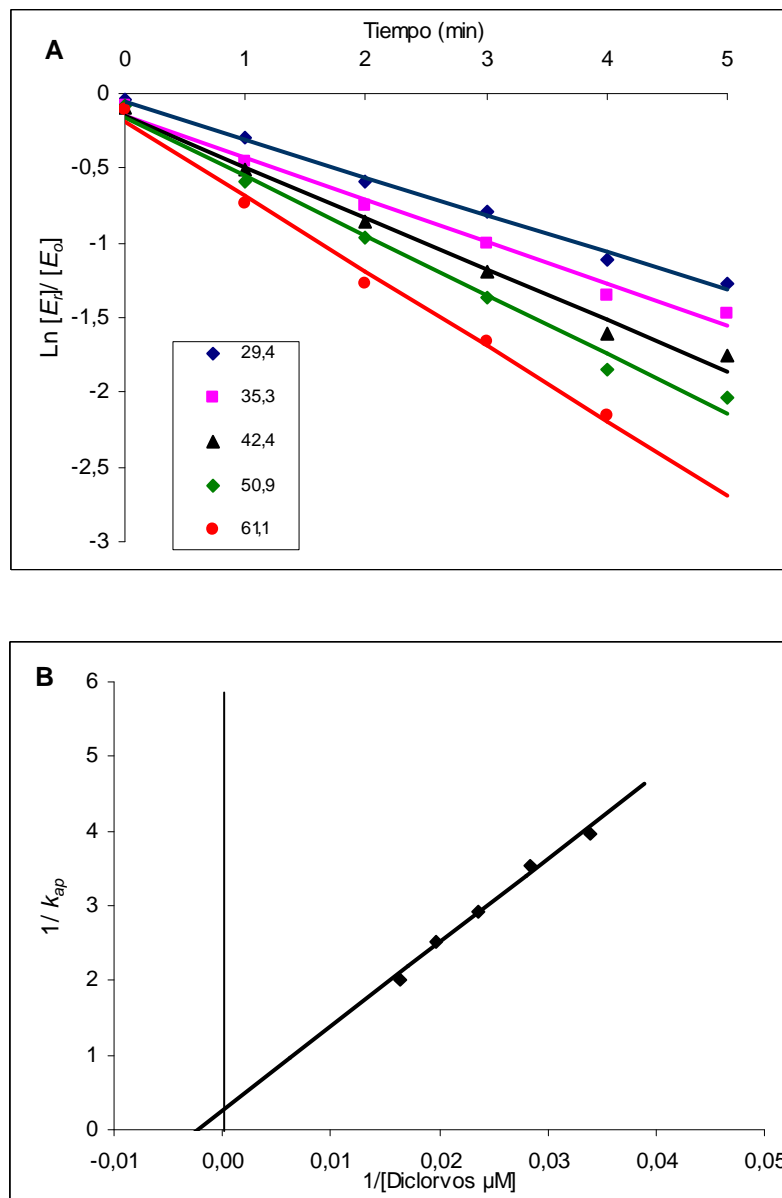


Figura 4.50. Cinética de la inhibición de la AChE cerebral de la dorada por diclorvos. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de diclorvos (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

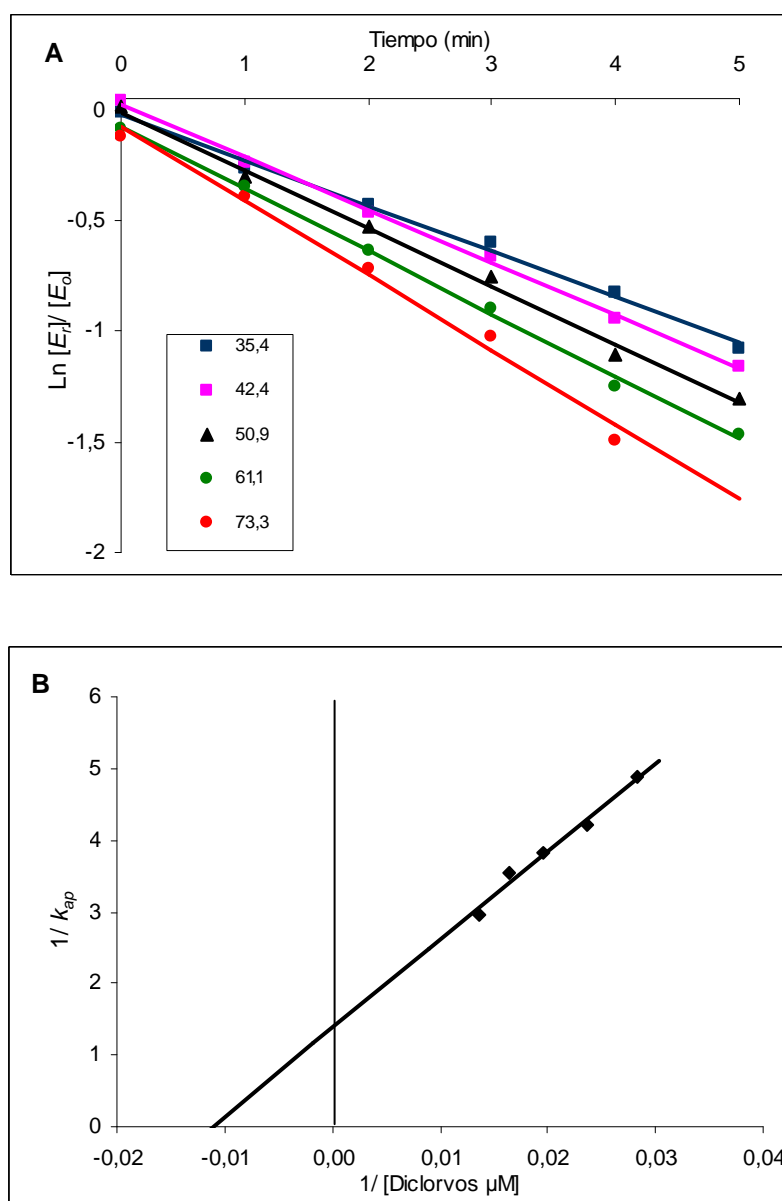


Figura 4.51. Cinética de la inhibición de la AChE muscular de la dorada por diclorvos. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de diclorvos (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

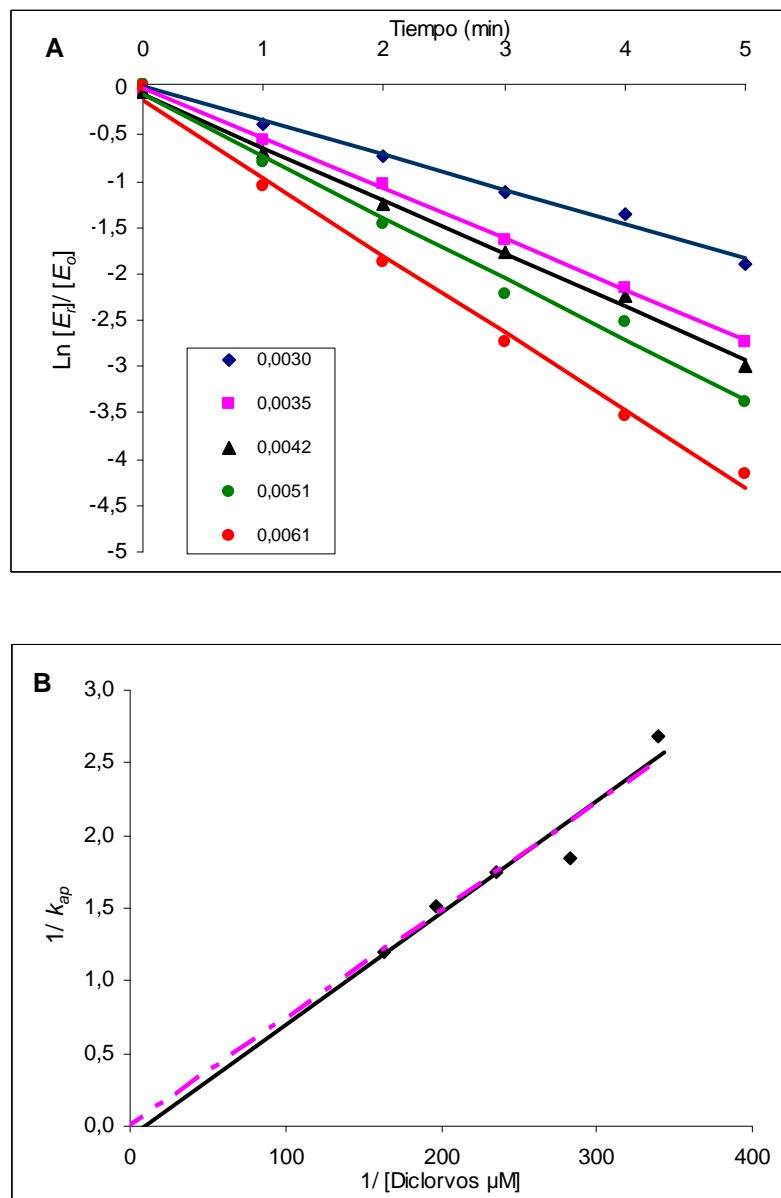


Figura 4.52. Cinética de la inhibición de la BChE muscular de la dorada por diclorvos. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de diclorvos (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

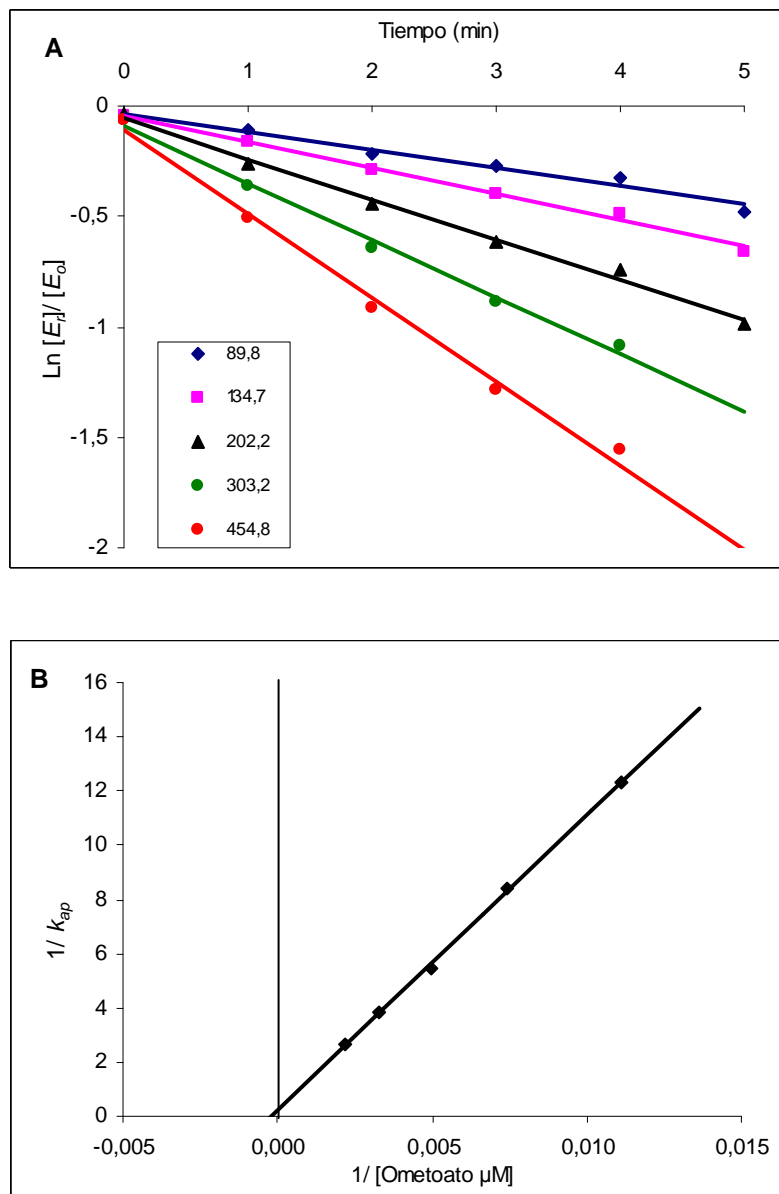


Figura 4.53. Cinética de la inhibición de la AChE cerebral de la dorada por ometoato. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de ometoato (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

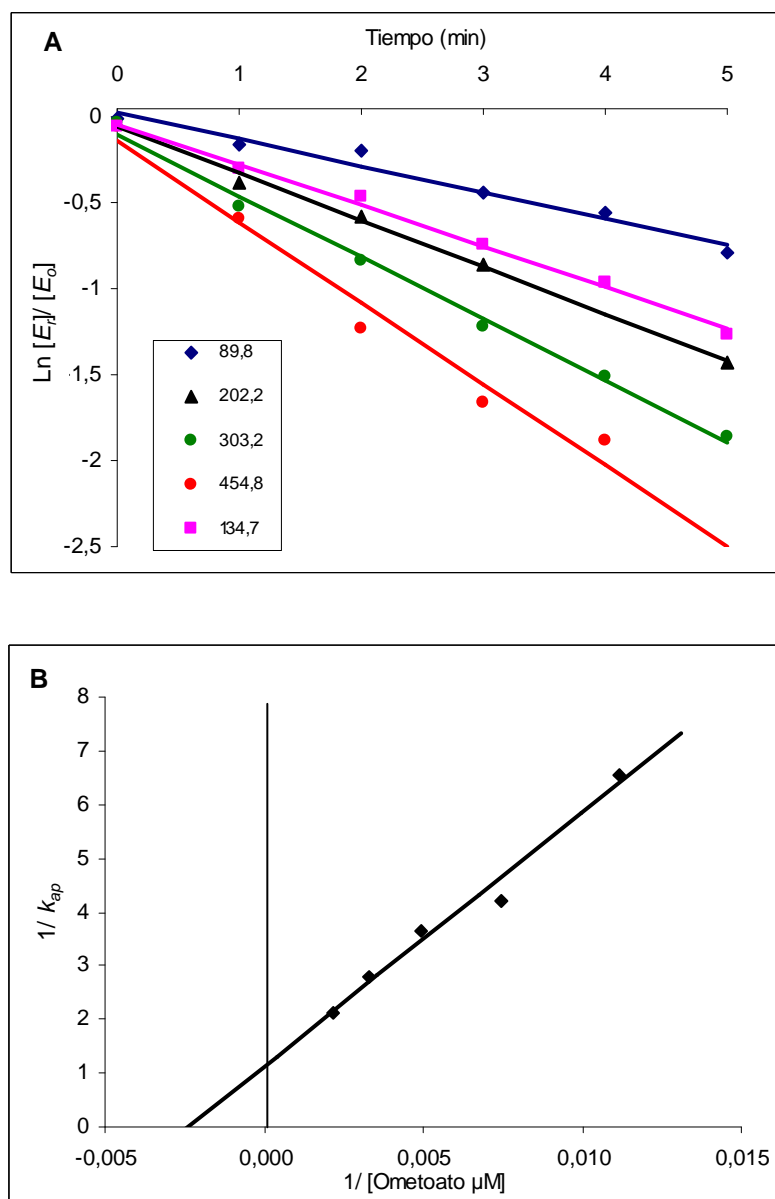


Figura 4.54. Cinética de la inhibición de la AChE muscular de la dorada por ometoato. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de ometoato (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

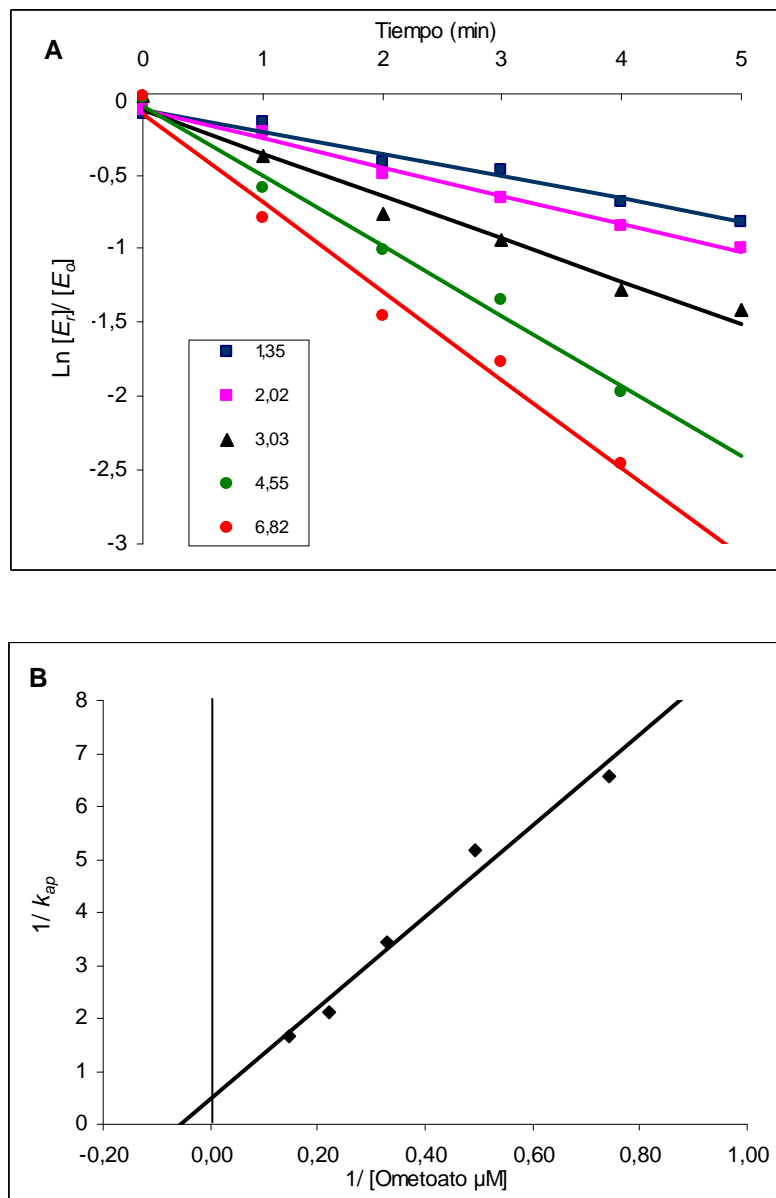


Figura 4.55. Cinética de la inhibición de la BChE muscular de la dorada por omotoato. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de omotoato (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

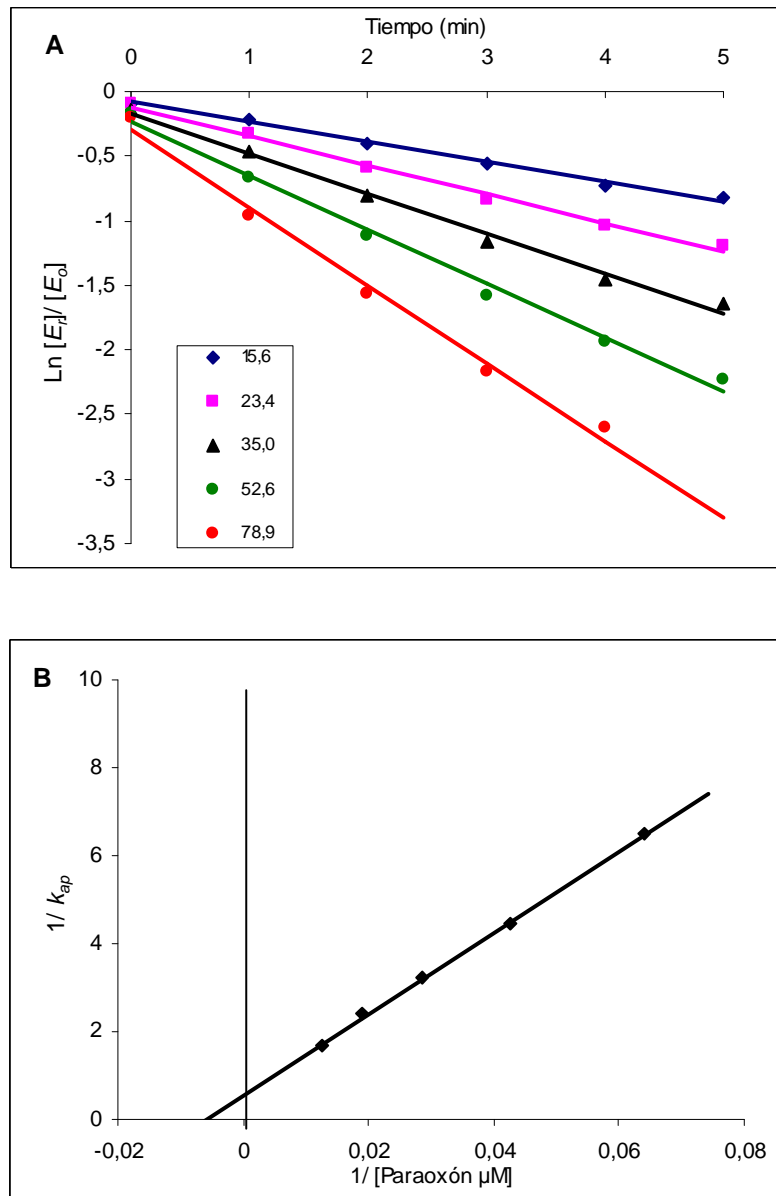


Figura 4.56. Cinética de la inhibición de la AChE cerebral de la dorada por paraoxón. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de paraoxón (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

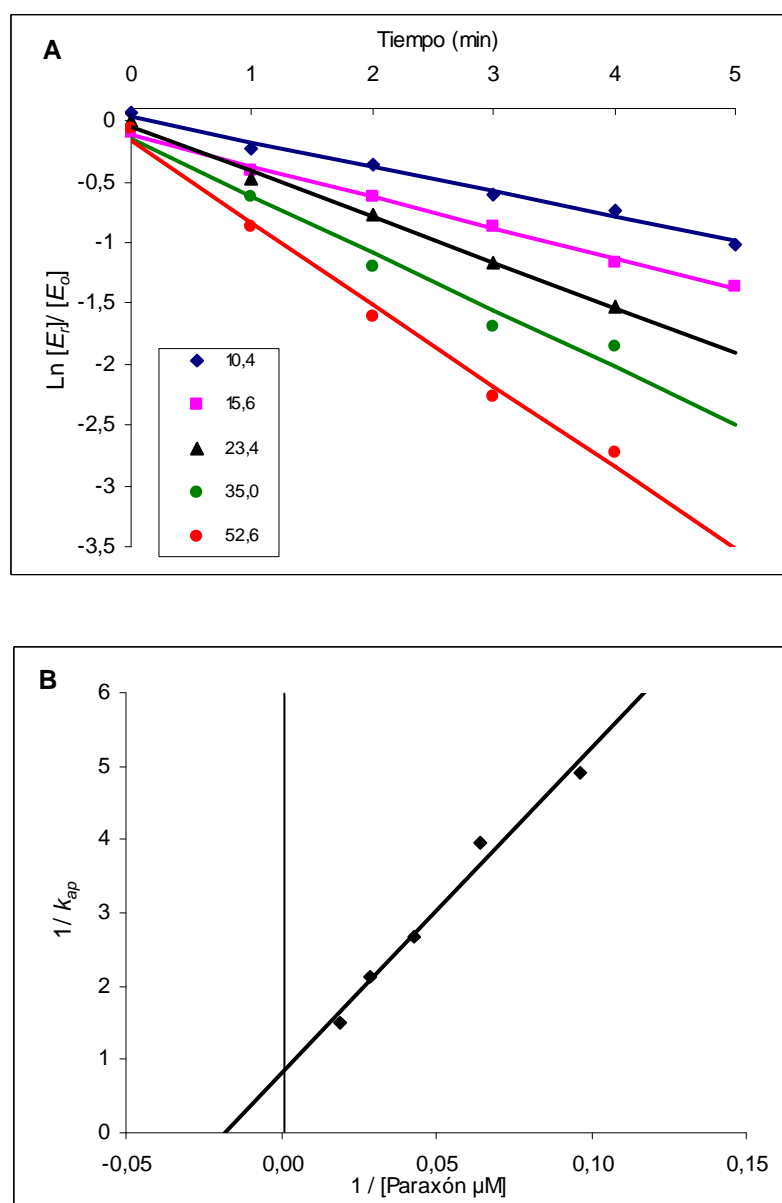


Figura 4.57. Cinética de la inhibición de la AChE muscular de la dorada por paraoxón. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de paraoxón (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

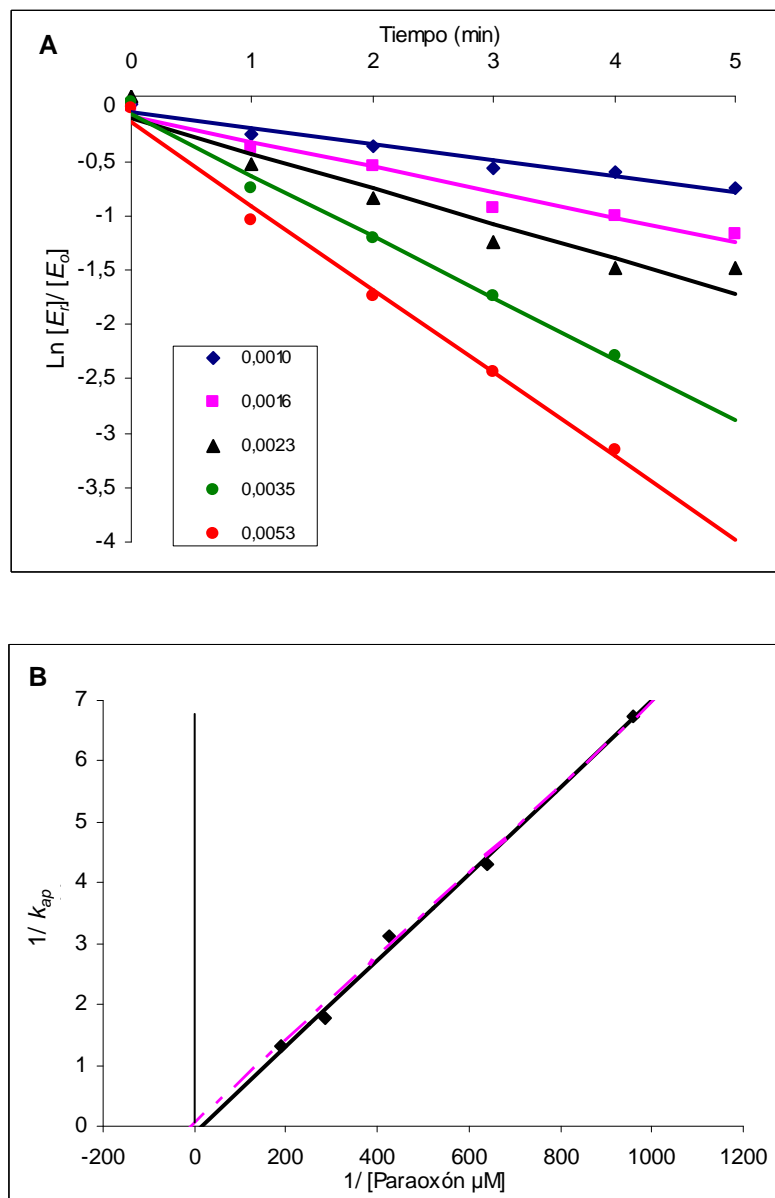


Figura 4.58. Cinética de la inhibición de la BChE muscular de la dorada por paraoxón. (A) Representación del logaritmo de la actividad residual en función del tiempo de incubación de la enzima y distintas concentraciones de paraoxón (μM). (B) Representación de los dobles recíprocos de la constante de velocidad aparente en función de la concentración de inhibidor.

Tabla 4.7. Constantes cinéticas y CI_{50} para la inhibición de las ChE presentes en cerebro (c) y músculo (m) de *Sparus aurata* por azinfosmetil-oxón (AZO), diclorvos (DCV), ometoato (OMT) y paraoxón (PRO).

OF	ChE	k_p (min ⁻¹)*	K_d (μM)*	k_i (mM ⁻¹ min ⁻¹)*	CI_{50} (nM)*
AZO	AChE (c)	0,717±0,238	0,656±0,248	1127,7±48,9	20,6±0,9
	AChE (m)	0,372±0,046	0,155±0,034	2514,3±247,7	9,4±0,9
	BChE (m)	0,326±0,011	0,157±0,009	2084,4±85,1	11,1±0,5
DCV	AChE (c)	3,74±0,59	421,1±61,6	8,86±0,11	2609,9±3,32
	AChE (m)	0,747±0,129	92,6±21,8	8,33±0,59	2799,9±191,4
	BChE (m)	-	-	130571,4±1384,2	0,177±0,004
OMT	AChE (c)	5,09±0,99	5837,1±1394,7	0,851±0,039	27271,5±1226,6
	AChE (m)	1,13±0,19	613,7±92,2	1,84±0,03	12566,1±197,7
	BChE (m)	1,85±0,16	15,4±2,1	122,3±9,2	190,9±13,5
PRO	AChE (c)	2,10±0,15	196,1±16,0	10,9±1,5	2212,8±362,0
	AChE (m)	1,55±0,39	75,6±26,0	21,74±1,7	1077,3±91,6
	BChE (m)	-	-	148838,3±4981,9	0,156±0,005

* Media ± eem

4. 3. 2. ESTUDIOS *in vivo*

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* realizados con los distintos organofosforados objeto de este estudio sobre *Sparus aurata*. El primer subapartado recoge los resultados de los ensayos preliminares tras la administración vía i.p. de diferentes dosis subletales de los OF, mientras que en el segundo se exponen los resultados obtenidos en los ensayos de recuperación durante 168 horas (7 días) tras la administración de una única dosis de estos plaguicidas.

4. 3. 2. 1. Ensayos preliminares dosis-respuesta

En los estudios preliminares dosis-respuesta con azinfosmetil, diclorvos, dimetoato y paratión se estudió la actividad colinesterasa presente en el cerebro de la dorada (AChE) 24 horas después de la administración i.p. de cada compuesto. Los resultados se muestran en las Figuras 4.59 a 4.62.

El análisis estadístico permitió constatar que en el caso del azinfosmetil (Figura 4.59) todas las dosis utilizadas en el ensayo produjeron una disminución de la actividad enzimática respecto al grupo control (inyectado con aceite de maíz). Asimismo, se observaron diferencias significativas entre la actividad AChE cerebral medida en los animales tratados con las dosis más bajas (2 y 3,2 mg/kg) del azinfosmetil y la más alta (4 mg/kg).

Del mismo modo, el tratamiento con dimetoato afectó significativamente los niveles de AChE cerebral de la dorada, observándose diferencias significativas en todos los grupos respecto a los controles inyectados con el correspondiente vehículo (suero salino), así como entre los grupos tratados con 10 mg/kg y 20 mg/kg (Figura 4.61).

Por otro lado, la administración por vía i.p. del paratión indujo un efecto inhibitorio significativo sobre la AChE cerebral de *Sparus aurata* solo con la dosis más alta (7,5 mg/kg) de las utilizadas (Figura 4.62). Igualmente, se observaron diferencias significativas entre la actividad AChE cerebral de los peces tratados con esta dosis respecto a los tratados con las dos dosis más bajas.

Finalmente, el análisis estadístico realizado mostró que transcurridas 24 horas tras la administración vía i.p. de 8,8 mg/kg, 11,7 mg/kg y 23,3 mg/kg de diclorvos no se observaban diferencias significativas en los niveles de AChE cerebral respecto a los controles inyectados con aceite de maíz (Figura 4.60).

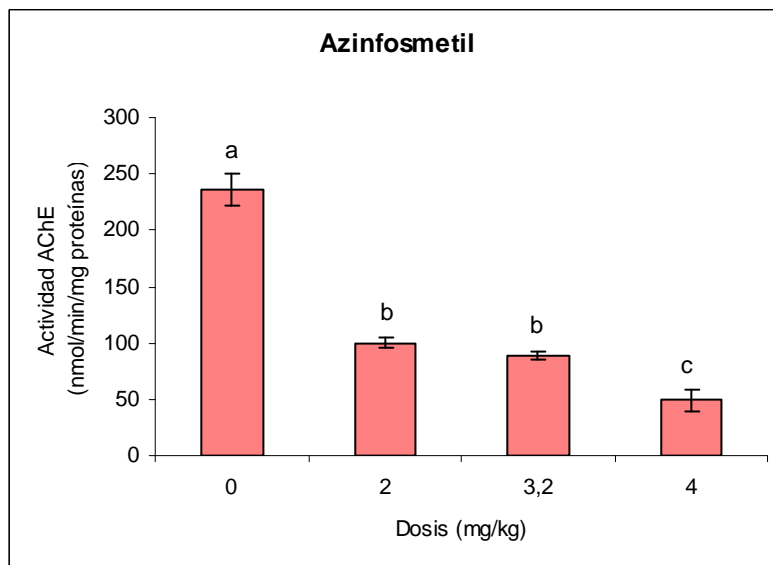


Figura 4.59. Efecto de distintas dosis de azinfosmetil sobre la actividad acetilcolinesterasa en cerebro de dorada 24 h después de su administración por vía i.p. Los valores representan las medias \pm eem para tres ejemplares en cada grupo. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

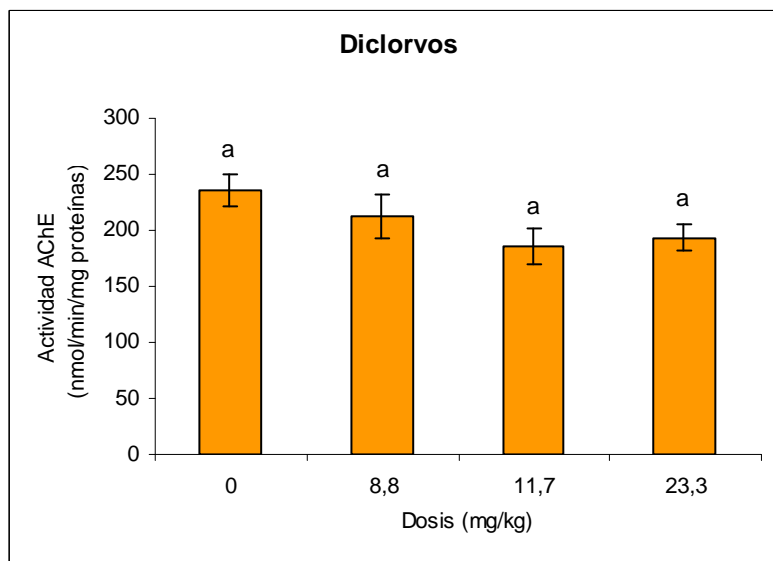


Figura 4.60. Efecto de distintas dosis de diclorvos sobre la actividad acetilcolinesterasa en cerebro de dorada 24 h después de su administración por vía i.p. Los valores representan las medias \pm eem para tres ejemplares en cada grupo. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

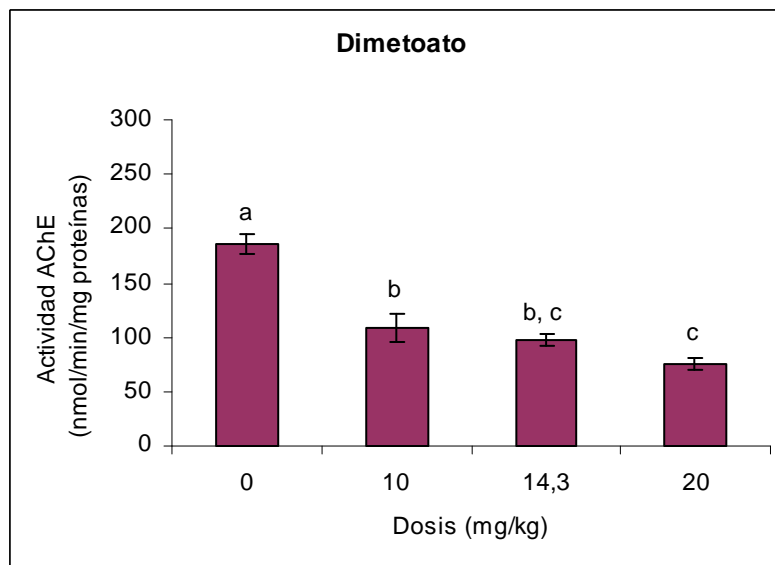


Figura 4.61. Efecto de distintas dosis de dimetoato sobre la actividad acetilcolinesterasa en cerebro de dorada 24 h después de su administración por vía i.p. Los valores representan las medias \pm eem para tres ejemplares en cada grupo. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

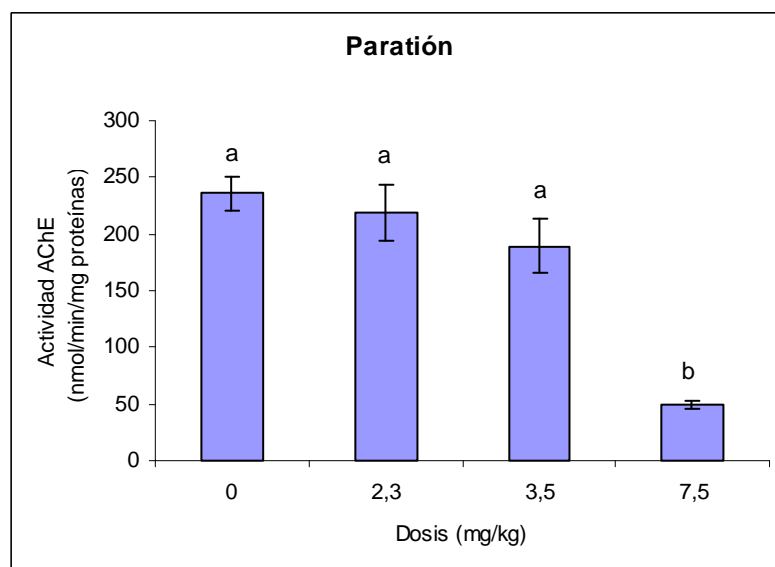


Figura 4.62. Efecto de distintas dosis de paratión sobre la actividad acetilcolinesterasa en cerebro de dorada 24 h después de su administración por vía i.p. Los valores representan las medias \pm eem para tres ejemplares en cada grupo. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las dosis finalmente elegidas para los posteriores tratamientos de recuperación fueron 4 mg/kg, 23,3 mg/kg, 20 mg/kg y 7,5 mg/kg para azinfosmetil, diclorvos, dimetoato y paratión, respectivamente (Tabla 4.8). Estas dosis produjeron un porcentaje de inhibición de la actividad AChE en cerebro de los ejemplares del 79, 18, 59 y 79%, respectivamente (Tabla 4.10). En el caso de los compuestos azinfosmetil, paratión y dimetoato la dosis elegida fue la más alta de las tres utilizadas en los ensayos preliminares puesto que dicha dosis afectaba de modo significativo a la actividad colinesterasa de los peces a las 24 h del tratamiento sin que se produjeran bajas entre los ejemplares. Únicamente se observó mortalidad en un ejemplar tratado con una dosis inferior de dimetoato (14,3 mg/kg) vía i.p., no teniéndose en cuenta para el cálculo de la actividad AChE. A pesar de que ninguna de las dosis de diclorvos utilizadas en los ensayos previos afectaba de modo significativo la actividad AChE cerebral de la dorada transcurridas 24 h, se optó por no utilizar una dosis superior, siendo elegida también la dosis más alta de las ensayadas (23,3 mg/kg). En este caso, se tuvo en cuenta que este compuesto, a diferencia de los otros, es de tipo fosfato, y por lo tanto un “inhibidor directo” de las colinesterasas. Es de esperar, pues, que la máxima inhibición de las colinesterasas se alcance mucho más rápidamente que con los otros compuestos, en las primeras horas tras el tratamiento por vía i.p., tal como se comprobó posteriormente en los ensayos de recuperación.

Tabla 4.8. Dosis (mg/kg) seleccionadas de cada uno de los organofosforados objeto de estudio para los ensayos de recuperación de la actividad colinesterasa.

Azinfosmetil	Diclorvos	Dimetoato	Paratión
4	23,3	20	7,5

En la Tabla 4.9 se muestra la dosis efectiva media (DE_{50}) obtenida para la inhibición de la AChE cerebral de *Sparus aurata* estimada para cada insecticida, definida como la dosis administrada por vía i.p. necesaria para inhibir un 50% de la actividad AChE cerebral. De los valores aquí recogidos se deduce que la AChE cerebral de la dorada fue 3 veces más sensible al azinfosmetil que al paratión, mientras que su sensibilidad frente a dimetoato fue unas 9 veces menor. Este mismo orden de sensibilidad de la AChE cerebral frente a los distintos OF se deduce si se tiene en cuenta que una dosis similar de azinfosmetil (2 mg/kg) y paratión (2,3 mg/kg) indujo una inhibición mucho más pronunciada de la AChE cerebral en el primer caso

(58%) que en el segundo (7%), mientras que una dosis diez veces mayor de dimetoato (20 mg/kg) produjo el mismo grado de inhibición (58%). Para el diclorvos no pudo calcularse este indicador de toxicidad debido a que a las dosis utilizadas no se observó una inhibición significativa de la AChE transcurridas 24 horas desde el tratamiento.

Tabla 4.9. Valores de la DE₅₀ para la inhibición de la AChE cerebral de *Sparus aurata*.

Insecticida	DE ₅₀ (mg/kg)	Intervalo de confianza del 95%
Azinfosmetil	1,74	1,52-2,23
Dimetoato	16,20	11,80-19,87
Paratión	5,53	4,36-6,43
Diclorvos	-	-

Tabla 4.10. Porcentajes de inhibición obtenidos con las diferentes dosis utilizadas.

Insecticida	Dosis (mg/kg)	% de Inhibición
Azinfosmetil	2	58
	3,2	63
	4	79
Dimetoato	10	42
	14,3	48
	20	59
Paratión	2,3	7
	3,5	20
	7,5	79
Diclorvos	8,8	10
	11,7	21
	23,3	18

4. 3. 2. 2. Ensayos de recuperación de la actividad colinesterasa

Los ensayos de recuperación de la actividad ChE se realizaron utilizando las dosis subletales seleccionadas en los ensayos preliminares dosis-respuesta con el fin de observar la evolución de las ChE presentes en el cerebro y en el músculo de la dorada durante un periodo de 168 horas (7 días) tras la administración i.p. de cada compuesto. Asimismo, se estudió la evolución temporal de estas enzimas en los ejemplares control a los que se les administró por vía i. p. aceite de maíz o suero fisiológico, vehículos en los que se disolvieron los insecticidas para su administración.

Los valores de actividad de las enzimas ChE medidos en aquellas doradas tratadas solamente con aceite de maíz o NaCl 0,9% se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de una variable considerando el tiempo de muestreo como factor. Este análisis reveló que para cada vehículo no existían diferencias significativas entre los grupos sacrificados a las diferentes horas, por lo que se decidió considerarlos en cada caso como un mismo grupo para los análisis estadísticos posteriores. Los valores medios de la actividad ChE medida en el cerebro y en el músculo de los ejemplares control tratados solo con vehículo en los distintos periodos de tiempo y los resultados del análisis de la varianza se muestran en las Tablas 4.11 y 4.12.

Tabla 4.11. Actividad ChE presente en el cerebro y en el músculo de ejemplares control tratados con aceite de maíz y resultados del análisis de la varianza.

Actividad ChE	Tiempo de muestreo (horas)					Estadísticos*
	3	9	24	48	168	
AChE cerebral	245,14 ±12,06	281,37 ±15,63	294,98 ±26,62	282,43 ±7,18	269,34 ±26,56	$F_{[14,4]}=0,956$ ($p=0,472$)
AChE muscular	9,95 ±0,57	11,06 ±3,12	11,53 ±2,34	12,66 ±1,38	13,06 ±1,93	$F_{[14,4]}=1,084$ ($p=0,415$)
BChE muscular	24,29 ±0,12	21,09 ±3,15	23,13 ±2,59	27,78 ±2,99	26,90 ±5,24	$F_{[14,4]}=0,689$ ($p=0,616$)

La actividad específica es la media \pm eem expresada en nmol/min/mg proteínas (N=3 ejemplares).

*Estadístico **F** y su significación **p**; grados de libertad entre corchetes. Nivel de significación requerido $p<0,05$.

Tabla 4.12. Actividad ChE presente en el cerebro y en el músculo de ejemplares control tratados con suero fisiológico (NaCl 0,9%) y resultados del análisis de la varianza.

Actividad ChE	Tiempo de muestreo (horas)					Estadísticos*
	3	9	24	48	168	
AChE cerebral	226,93 ±7,58	263,20 ±62,52	266,60 ±39,40	259,11 ±62,01	280,84 ±28,34	$F_{[14,4]}=0,194$ ($p=0,936$)
AChE muscular	14,35 ±2,62	9,48 ±0,19	13,84 ±1,12	13,85 ±1,87	16,19 ±2,37	$F_{[14,4]}=2,036$ ($p=0,165$)
BChE muscular	23,09 ±2,73	29,52 ±6,16	30,12 ±4,25	35,83 ±2,08	32,63 ±3,07	$F_{[14,4]}=1,436$ ($p=0,292$)

La actividad específica es la media \pm eem expresada en nmol/min/mg proteínas (N=3 ejemplares).

*Estadístico **F** y su significación **p**; grados de libertad entre corchetes. Nivel de significación requerido $p<0,05$.

En la Tabla 4.13 se detalla la actividad ChE presente en cerebro y músculo de la dorada tras administración por vía i.p. de 4 mg/kg de azinfosmetil, 23,3 mg/kg de diclorvos, 20 mg/kg de dimetoato o 7,5 mg/kg de paratión, así como el correspondiente porcentaje de inhibición respecto a los controles. Las figuras 4.63 a 4.66 muestran la evolución temporal de la actividad ChE (% respecto al control) medida en cerebro y en músculo tras exposición a dichos insecticidas.

En el tratamiento con azinfosmetil, la actividad de la AChE cerebral presentó una inhibición de casi un 81% con respecto a la media de los controles transcurridas solamente 3 h desde la administración del compuesto (Tabla 4.13); sin embargo, la mayor inhibición de esta enzima (91,5%) se produjo a las 9 h del tratamiento. A partir de este momento la actividad colinesterasa en el cerebro mostró un ligero aumento, aunque solo se recuperó un 52,5% de la actividad de los controles transcurridos 7 días desde el tratamiento (Figura 4.63). Por su parte, en la actividad AChE muscular de los ejemplares tratados con azinfosmetil se apreció un leve descenso de la actividad AChE muscular a las 3 h de la inyección con respecto a los controles, siendo la inhibición alcanzada de apenas un 31%. Esta tendencia descendente de la actividad enzimática continuó observándose en los animales sacrificados tras 9 h desde la administración; sin embargo, se observó una cierta estabilización de la actividad de esta enzima en los ejemplares sacrificados posteriormente. En este ensayo, la mayor inhibición de la actividad AChE muscular no llegó al 65%. Por otro lado, se observó un

descenso progresivo en la actividad de la enzima BChE durante las primeras 24 h, momento en el que llegó a una inhibición del 84%, pero que alcanzó el 94,1% a los 7 días, tras una fase intermedia de recuperación parcial de la actividad a las 48 h.

La actividad de la AChE cerebral en los ejemplares de *Sparus aurata* tratados con diclorvos, experimentó una rápida inhibición en las tres primeras horas tras la exposición (57,3%), momento a partir del cual comenzó a recuperarse hasta que se alcanzaron niveles estadísticamente similares a los controles tras 7 días de permanencia en agua de mar (Tabla 4.13). El perfil de inhibición (máximo valor 54,5%) y recuperación de la AChE muscular fue prácticamente idéntico a la AChE cerebral (Figura 4.64), no obstante, la BChE muscular, aunque presentó una tendencia similar a las anteriores, el grado de inhibición fue bastante mayor, alcanzándose valores del 95,2% a las 3 h y llegando solo a recuperarse un 53% de la actividad control a los 7 días tras el tratamiento.

Tras la exposición a dimetoato, la actividad AChE en el cerebro de la dorada disminuyó ligeramente transcurridas 3 h tras la exposición, descenso que llegó a ser significativo a partir de las 9 h. Aunque el máximo nivel de inhibición se alcanzó a las 48 horas (77,6%), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a partir de las 9 h hasta el final del ensayo (Tabla 4.13). Análogamente, la enzima AChE muscular medida en las doradas tratadas mostró una tendencia similar a la descrita para la AChE cerebral. Por el contrario, la enzima BChE presente en el músculo mostró un comportamiento totalmente distinto tras la administración de este compuesto. En este caso, la enzima presentó una inhibición casi completa a lo largo del período de estudio y ya desde las primeras 3 horas tras la administración (Figura 4.65).

En los tratamientos con paratión, la actividad de la AChE presente en el cerebro de la dorada mostró un ligero descenso durante las primeras 9 horas tras la administración, siendo este descenso más pronunciado y estadísticamente significativo a partir de las 24 h. La mayor inhibición se produjo a las 48 h (76,5%), aunque las diferencias no fueron significativas desde las 24 horas hasta las 168 h que duró el ensayo (Tabla 4.13). La enzima AChE muscular presentó una tendencia similar. En lo referente a la actividad BChE en músculo, se observó un descenso progresivo en la actividad de la enzima BChE durante las primeras 24 h tras la administración que llegó a una inhibición del 90,1% y que alcanzó el 97,1% a los 7

días. También en este caso, al igual que ocurrió en el tratamiento con azinfosmetil, se detectó una fase intermedia de recuperación parcial de la actividad a las 48 h (Figura 4.66).

Tabla 4.13. Actividad ChE específica en nmol/min/mg proteínas presente en cerebro y músculo de *Sparus aurata* tras administración por vía i.p. de 4 mg/kg de azinfosmetil, 23,3 mg/kg de diclorvos, 20 mg/kg de dimetoato o 7,5 mg/kg de paratión y porcentaje de inhibición respecto a los controles.

	Tiempo (h)	Actividad*		
		AChE cerebro	AChE músculo	BChE músculo
Azinfosmetil	Control aceite	274,6 ± 8,56 A [#]	11,65 ± 0,55 A	24,64 ± 1,41 A
	3	53,13 ± 9,02 B (80,6)	8,03 ± 1,02 B (31,1)	18,43 ± 2,83 B (25,2)
	9	23,43 ± 3,04 C (91,5)	5,13 ± 0,40 BC (56,0)	9,49 ± 1,16 C (61,5)
	24	40,89 ± 8,93 BC (85,1)	4,27 ± 0,78 CD (63,3)	3,96 ± 1,28 CD (83,9)
	48	82,96 ± 5,88 D (69,8)	5,02 ± 2,30 BD (56,9)	9,14 ± 1,07 C (62,9)
	168	144,2 ± 27,41 E (47,5)	4,33 ± 0,71 CD (62,9)	1,45 ± 0,90 D (94,1)
Diclorvos	3	117,4 ± 36,68 B (57,3)	5,30 ± 0,64 B (54,5)	1,19 ± 0,69 B (95,2)
	9	169,6 ± 53,40 BC (38,3)	6,71 ± 2,01 BC (42,4)	5,31 ± 2,28 BD (78,4)
	24	238,5 ± 24,17 AC (13,2)	9,31 ± 1,44 ACD (20,1)	12,74 ± 5,88 C (48,3)
	48	219,96 ± 8,50 AC (19,9)	8,21 ± 1,37 BD (29,5)	13,42 ± 3,94 CD (45,5)
	168	256,6 ± 13,68 A (6,6)	10,70 ± 0,97 AD (8,2)	13,00 ± 0,82 CD (47,2)
	3	254,9 ± 11,02 A (7,2)	9,93 ± 1,30 AB (14,8)	23,05 ± 2,67 A (6,4)
Paratión	9	245,6 ± 6,41 A (10,6)	11,80 ± 0,64 A (-1,28)	22,16 ± 2,09 A (10,1)
	24	84,2 ± 13,39 B (69,3)	7,27 ± 3,11 B (37,6)	2,45 ± 1,13 B (90,1)
	48	64,6 ± 4,26 B (76,5)	3,16 ± 0,26 C (72,9)	7,51 ± 0,86 B (69,5)
	168	96,7 ± 25,76 B (64,8)	2,78 ± 0,13 C (76,1)	0,73 ± 0,19 B (97,1)

* La actividad colinesterasa está expresada como media ± eem. N=3 para todos los grupos excepto el grupo control donde N=15. El porcentaje de disminución respecto a los controles se indica entre paréntesis.

[#] Las distintas letras situadas junto a las medias en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (p<0.05).

Tabla 4.13. Continuación. Actividad ChE específica en nmol/min/mg proteínas presente en cerebro y músculo de *Sparus aurata* tras administración por vía i.p. de 4 mg/kg de azinfosmetil, 23,3 mg/kg de diclorvos, 20 mg/kg de dimetoato o 7,5 mg/kg de paratión y porcentaje de inhibición respecto a los controles.

	Tiempo (h)	Actividad*		
		AChE cerebro	AChE músculo	BChE músculo
Dimetoato	Control NaCl	259,34 ± 17,69 A	13,54 ± 0,88 A	30,24 ± 1,86 A
	3	201,5 ± 12,01 A (22,3)	6,74 ± 1,62 B (50,2)	0,02 ± 0,02 B (100)
	9	88,7 ± 14,78 B (65,8)	3,91 ± 0,72 BC (71,1)	0,60 ± 0,50 B (98,2)
	24	64,0 ± 3,08 B (75,3)	2,99 ± 0,14 C (77,9)	0,01 ± 0,00 B (100)
	48	58,1 ± 3,58 B (77,6)	3,04 ± 0,36 C (77,5)	1,03 ± 0,89 B (97,0)
	168	103,9 ± 10,34 B (59,9)	3,45 ± 1,49 C (74,6)	1,54 ± 0,95 B (94,9)

* La actividad colinesterasa está expresada como media ± eem. N=3 para todos los grupos excepto el grupo control donde N=15. El porcentaje de disminución respecto a los controles se indica entre paréntesis.

Las distintas letras situadas junto a las medias en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

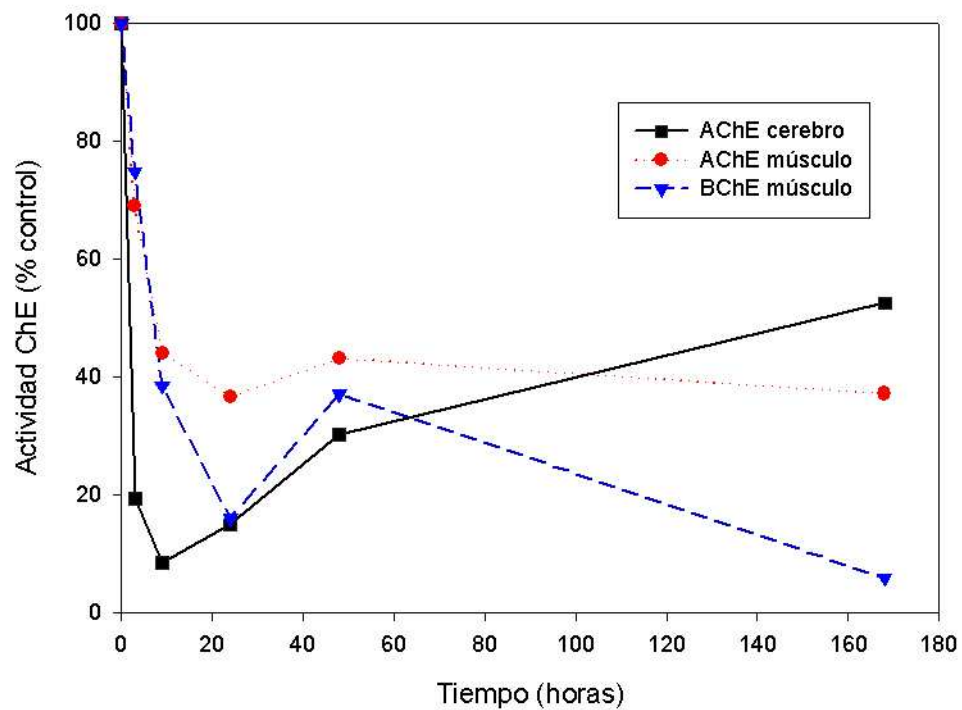


Figura 4.63. Evolución temporal de la actividad colinesterasa en el tejido cerebral y muscular de la dorada tras la administración de 4 mg/kg de azinfosmetil por vía intraperitoneal. Cada punto en la gráfica representa el porcentaje medio de actividad residual respecto a los animales control a los diferentes tiempos de muestreo.

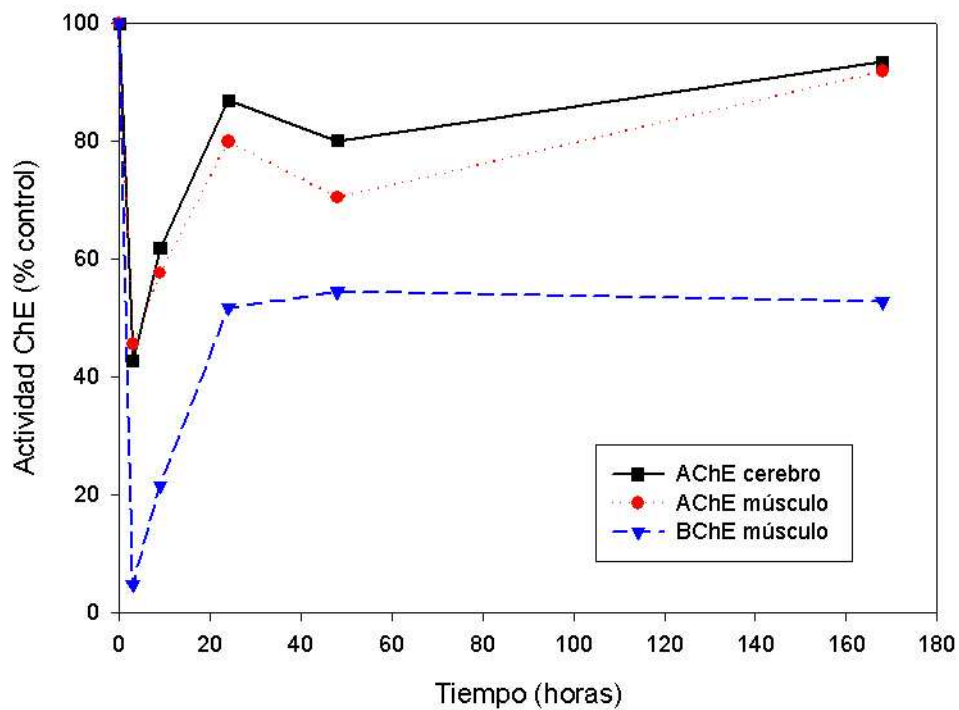


Figura 4.64. Evolución temporal de la actividad colinesterasa en el tejido cerebral y muscular de la dorada tras la administración de 23,3 mg/kg de diclorvos por vía intraperitoneal. Cada punto en la gráfica representa el porcentaje medio de actividad residual respecto a los animales control a los diferentes tiempos de muestreo.

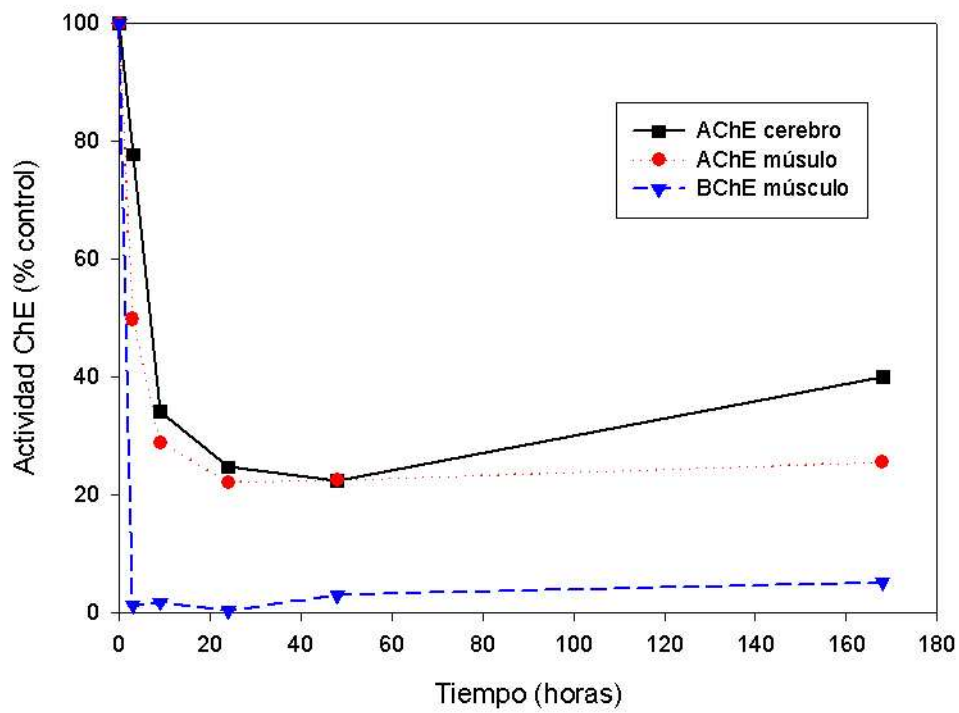


Figura 4.65. Evolución temporal de la actividad colinesterasa en el tejido cerebral y muscular de la dorada tras la administración de 20 mg/kg de dimetoato por vía intraperitoneal. Cada punto en la gráfica representa el porcentaje medio de actividad residual respecto a los animales control a los diferentes tiempos de muestreo.

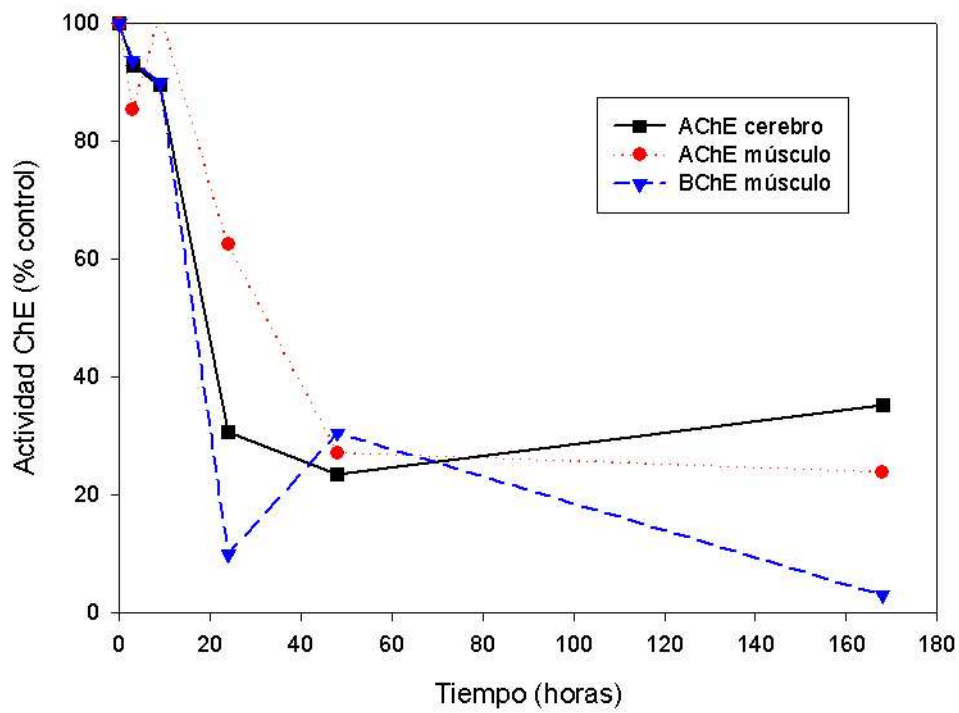


Figura 4.66. Evolución temporal de la actividad colinesterasa en el tejido cerebral y muscular de la dorada tras la administración de 7,5 mg/kg de paratión por vía intraperitoneal. Cada punto en la gráfica representa el porcentaje medio de actividad residual respecto a los animales control a los diferentes tiempos de muestreo.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS

5.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLINESTERASAS UTILIZANDO INHIBIDORES ESPECÍFICOS Y PREFERENCIA DE SUSTRATO

La inhibición total por eserina de la actividad medida sobre las distintas tiocolinas alquil sustituidas (ASCh, A β MSCh, BSCh y PSCh) tanto en cerebro como en músculo de la dorada indica que la actividad enzimática medida en nuestras condiciones experimentales es debida principalmente a colinesterasas y no a otro tipo de esterasas.

El comportamiento de la ChE presente en el cerebro de la dorada justifica su clasificación como AChE en todos los aspectos: hidroliza a ASCh y A β MSCh pero no muestra actividad sobre BSCh, es sensible a BW284c51 pero es resistente a iso-OMPA, y muestra inhibición por sustrato. Diversos estudios recogen la presencia exclusiva de actividad AChE en el tejido cerebral de peces como *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Serranus cabrilla* (Sturm y col., 1999), *Dicentrarchus labrax* (Varò y col., 2003), *Gambusia yucatana* (Rendon von Osten y col., 2005) y *Limanda yokohamae* (Jung y col., 2007).

Por otro lado, las enzimas presentes en músculo hidrolizan a los sustratos A β MSCh y BSCh, lo que sugiere que ambas enzimas (AChE y BChE) están presentes en este tejido. La presencia de actividad ChE sensible a iso-OMPA sobre BSCh en músculo, pero no en cerebro, demuestra que el músculo contiene una ChE distinta a la AChE cerebral. También sugiere la presencia de más de un tipo de ChE, la inhibición parcial de la actividad muscular sobre A β MSCh por iso-OMPA, aunque esta inhibición permanece constante a partir de 10^{-5} M. La explicación más probable para esta observación es que la actividad medida sobre BSCh y la fracción sensible a iso-OMPA de la actividad sobre A β MSCh y ASCh están mediadas por la misma ChE. Por lo tanto, pensamos que tanto en cerebro como en el músculo de la dorada existe una AChE con propiedades típicas (resistente a iso-OMPA), además de una BChE en músculo atípica (sensible a BW284c51). Las propiedades atípicas que presenta esta BChE son su capacidad para hidrolizar A β MSCh (y ASCh) y su sensibilidad a BW284c51. El iso-OMPA es un inhibidor supuestamente selectivo para BChE, pero no debería afectar a la actividad medida con A β MSCh, sustrato supuestamente selectivo para AChE. Por su parte, el BW284c51 debería inhibir una AChE, como se observa

con A β MSCh, pero debería alcanzar solo un 40% de inhibición a 10^{-4} M con una BChE típica (Lundin, 1968). La completa inhibición de actividad sobre BSCh por concentraciones iguales o superiores a 10^{-5} M de iso-OMPA está de acuerdo con las especificidades esperadas de los compuestos diagnósticos y apoya la presencia de BChE sugerida anteriormente. A estas concentraciones de iso-OMPA se produce una completa inhibición de la actividad BSCh sin inhibición de la AChE, por lo tanto es el rango óptimo para la medida correcta de la actividad AChE. En nuestros estudios posteriores elegimos una concentración de 10^{-5} M de iso-OMPA para la medida de la actividad AChE para realizar el estudio de la actividad colinesterasa basal en *Sparus aurata*, así como en los ensayos *in vitro* e *in vivo* con los distintos compuestos organofosforados.

La anterior interpretación es coherente con la idea establecida de que en los vertebrados, incluidos los peces, existen solo dos tipos de colinesterasas, AChE y BChE, y que las propiedades catalíticas y las sensibilidades a los inhibidores son consistentes dentro de cada grupo a pesar del polimorfismo presente en cada grupo (Massoulié y col., 1993). Además, está en total sintonía con los datos recogidos en otros estudios de peces marinos y de agua dulce. Así, encontramos peces con ChE muscular que consta de una AChE y una BChE atípica como *Pleuronectes platessa* (Lundin, 1968), *Torpedo marmorata* (Toutant y col., 1985), *Acanthurus dussumieri* (Leibel, 1988), *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Serratus cabrilla* (Sturm y col., 1999), *Gasterosteus aculeatus* (Sturm y col., 2000), *Oreochromis niloticus* (Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004), *Limanda yokohamae* (Jung y col., 2007) y *Haemulon plumieri* (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008). Los resultados obtenidos por nosotros están de acuerdo con los mencionados por Varò y col. (2007) en juveniles de *Sparus aurata*. En un trabajo anterior (Arufe y col., 2007), nuestro grupo ha caracterizado la actividad colinesterasa presente en larvas de dorada en fase de alimentación endógena como AChE, mientras que en esta fase temprana del ciclo vital de esta especie no está presente actividad BChE detectable.

La existencia de colinesterasas con propiedades atípicas en relación con los inhibidores selectivos y/o sus preferencias de sustrato ha sido mencionado en numerosos estudios no solo con vertebrados sino también en invertebrados marinos (Bonacci y col., 2006; Cunha y col., 2007; Bonacci y col., 2008).

5. 1. 2. PARAMETROS CINÉTICOS

La K_m o constante de Michaelis-Menten de la enzima para su sustrato se puede definir como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la máxima (V_{max}). La K_m se puede considerar como una medida de la afinidad de un enzima por su sustrato, ya que si la constante es baja se requiere poca cantidad de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima y por ello la afinidad de la enzima por su sustrato es elevada, y viceversa. Por lo tanto, si una enzima tiene un valor pequeño de K_m consigue una gran eficacia catalítica a bajas concentraciones de sustrato. Sin embargo, la verdadera eficacia se mide no solo por la K_m , sino por la relación V_{max}/K_m , ya que cuanto mayor es esta relación, mayor será la eficacia catalítica de la enzima.

Los valores de K_m , V_{max} y V_{max}/K_m determinados en el cerebro de dorada para el sustrato ASCh fueron 0,16 mM, 243,09 nmol/min/mg proteínas y 1,52 mL/min/mg proteínas, respectivamente. Estos resultados se encuentran en el rango de los obtenidos por otros autores (Tabla 5.1). Por ejemplo, Oliveira y col. (2007) refieren valores de K_m comprendidos entre 0,104 y 0,291 mM para la AChE cerebral de unas 20 especies de peces neotropicales marinos. Valores similares de K_m presentaron los peces estuarinos *Cathorops spixii* (0,196 mM) y *Micropogonias furnieri* (0,201 mM) (Tortelli y col., 2006) y los peces marinos *Paralichthys brasiliensis* (0,209 mM) o *Cynoscion striatus* (0,206 mM) (Filho y col., 2004). Análogamente, otros autores recogen valores de K_m similares a éstos para peces dulceacuícolas como *Pseudorasbora parva*, *Carassius auratus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio* o *Cnesterodon decemmaculatus* (Tabla 5.1). También, el valor de V_{max} para la AChE cerebral es comparable con los valores encontrados en otros peces (entre 200-250 nmol/min/mg proteínas) como en el caso de *Ictalurus punctatus* (Carr y Chambers, 1996), *Oreochromis niloticus* (Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004), *Oncorhynchus mykiss* (Shaonan y col., 2004) o *Haemulon plumieri* (Alpuche-Gaul y Gold-Bouchot, 2008). Sin embargo, para otras especies, la velocidad máxima duplica estos valores como en *Cyprinus carpio* y *Cnesterodon decemmaculatus* (De la Torre y col., 2002) o *Pseudorasbora parva* y *Carassius auratus* (Shaonan y col., 2004). Por el contrario, la V_{max} de *Cathorops spixii* y *Micropogonias furnieri* es un orden de magnitud inferior (Tortelli y col., 2006).

Los parámetros K_m y V_{max} estimados en *Sparus aurata* para la ChE muscular medida sobre ASCh fueron 0,24 mM y 32,21 nmol/min/mg proteínas, respectivamente, mientras que para la actividad medida sobre BSCh se obtuvieron valores de 0,16 mM y 16,07 nmol/min/mg proteínas, respectivamente. Por lo tanto, la afinidad de la actividad ChE medida en músculo para ASCh fue 1,5 veces menor que la medida para BSCh, como indican sus valores de K_m . Por el contrario, la eficacia hidrolítica de la ChE muscular sobre ASCh fue el doble que la correspondiente sobre BSCh, como se deduce de sus valores V_{max} . Los valores de ambos parámetros cinéticos, y en especial V_{max} , son mucho más bajos que los publicados para otros peces como *Haemulon plumieri*, *Pleuronectes vetulus* y *Oreochromis niloticus* (Tabla 5.2), aunque el número de referencias encontradas para poder establecer comparaciones es limitado. Sin embargo, considerando la relación V_{max}/K_m , se observa que eficacia catalítica de la AChE muscular en la dorada es comparable a la de esas especies, mientras que en el caso de la ChE medida sobre BSCh este cociente toma valores intermedios a los encontrados en la bibliografía. Los valores estimados por nosotros para las constantes cinéticas, V_{max} y K_m , en larvas endotróficas de dorada fueron $333,7 \pm 2,8$ nmol/min/mg proteínas y $0,163 \pm 0,008$ mM, respectivamente (Arufe y col., 2007).

Un mayor valor de V_{max} puede sugerir que la AChE tiene simplemente un mayor título de enzimas. También se ha descrito que enzimas con un papel fisiológico específico generalmente manifiestan un valor K_m bajo y una V_{max} alta (Kapin y Ahmed, 1980). Por su parte, una menor eficacia catalítica de la ChE puede deberse a: una reducción de la acilación y de la desacilación, una disminución de la afinidad del sitio periférico responsable de la unión inicial al borde de la garganta catalítica y disminución del deslizamiento en el sitio libre y en el sitio acetilado (Frasco y col., 2006).

Las diferencias interespecíficas e interfamiliares en la actividad ChE entre los peces pueden tener una base bioquímica o fisiológica. A nivel molecular podría deberse bien a peculiaridades en la actividad del centro catalítico y/o diferente contenido de ChE en el tejido (Chuiko y col., 2003). Se ha observado que el valor de la constante catalítica o número de recambio, K_{cat} (número de moléculas de sustrato transformadas por centro activo en unidad de tiempo), para la AChE cerebral en distintos peces es similar, e incluso está en consonancia con grupos evolutivos tan distintos como insectos, anfibios, aves y mamíferos, lo que sugiere que el valor de k_{cat} puede no ser un factor que explique las diferencias interfamiliares observadas entre

los teleósteos, sino que probablemente estas diferencias se deban a un contenido distinto de AChE en las distintas especies (Chuiko y col., 2003).

Como es bien sabido, el principal papel de las ChE es la hidrólisis de la acetilcolina y ésteres de colina relacionados. Un exceso de ACh inhibe la actividad AChE y activa la BChE (Silver, 1974); por lo tanto, si el nivel tisular de ACh es alto la BChE sería más efectiva en su hidrólisis. En las 16 especies de peces teleósteos dulceacuículas estudiados por Chuiko y col. (2003), pertenecientes a las familias de los ciprínidos, pércidos, esócidos y lótididos, había una relación entre los niveles de actividad de ambas ChE y solo las especies con altos valores de actividad AChE en cerebro y plasma (la mayoría de los ciprínidos) tenían BChE. Según los autores, esto podría sugerir que la presencia de BChE en el plasma de la mayoría de los ciprínidos implica un mayor metabolismo de la ACh.

El significado fisiológico de las diferencias interfamiliares en la actividad ChE entre peces no está aclarado. Existen datos en otros animales como las aves, que evidencian que los mayores niveles de actividad AChE cerebral se encuentran en aves rapaces (Walker y Thompson, 1991). Sin embargo, en el estudio de Chuiko y col. (2003) los peces predadores tenían una menor actividad cerebral y plasmática y carecían de actividad BChE en comparación con los no predadores (esócidos, pércidos y lótididos son carnívoros, mientras que los ciprínidos se alimentan presumiblemente de bentos y plancton). Tal contradicción parece sugerir que existen otras razones, distintas al tipo de alimentación, que puedan explicar una diferente actividad AChE cerebral. Por otro lado, la actividad AChE cerebral en diferentes grupos filogenéticos de vertebrados ha sido relacionada con la capacidad motora y el número de células nerviosas presentes en el tejido cerebral (Lindeman, 1945). Asimismo, se ha indicado que la actividad AChE está correlacionada con el ritmo circadiano y la actividad general en los vertebrados (Pavan y col., 1979). También se tiene la opinión de que la presencia de actividad BChE es un indicador de alta movilidad funcional en vertebrados (Chernyshevskaya, 1983 en Chuiko 2003). Sin embargo, los peces predadores que Chuiko y col. (2003) investigaron eran crepusculares o nocturnos, mientras que la mayoría de los bentívoros y planctívoros eran diurnos (ciprínidos), régimen de actividad general que está asociado principalmente a su alimentación y comportamiento defensivo. Estos datos apoyan la hipótesis de que las diferencias interespecíficas e interfamiliares en la actividad AChE

cerebral entre los peces podrían también estar relacionadas con su actividad general y capacidad motora.

Tabla 5.1. Valores de K_m , V_{max} , V_{max}/K_m usando el sustrato ASCh para el tejido cerebral.

Especie	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	Referencias
<i>Carassius auratus</i> (D)	0,11 2	504.5	4,50	Shaonan y col., 2004
<i>Cathorops spixii</i> (M)	0,196	21,1	0,11	Tortelli y col., 2006
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (D)	0,170	464.6	2,73	De la Torre y col., 2002
<i>Cynoscion striatus</i> (M)	0,206	-		Filho y col., 2004
<i>Cyprinus carpio</i> (D)	0,230	482.1	2,10	De la Torre y col., 2002
<i>Dules auriga</i> (M)	0,164	-		Filho y col., 2004
<i>Genidens genidens</i> (M)	0,236	-		Filho y col., 2004
<i>Haemulon plumieri</i> (M)	0,310	237,8	0,77	Alpuche-Gaul y Gold-Bouchot, 2008
<i>Hypostomus punctatus</i> (D)	0,235	-		Filho y col., 2004
<i>Ictalurus punctatus</i> (D)	0,376	211.6	0,56	Carr y Chambers, 1996
<i>Leporinus macrocephalus</i> (D)	0,155	-		Filho y col., 2004
<i>Menticirrhus americanus</i> (M)	0,257	-		Filho y col., 2004
<i>Merluccius hubbsi</i> (M)	0,107	-		Filho y col., 2004
<i>Micropogonias furnieri</i> (M)	0,179	17,5	0,10	Tortelli y col., 2006
<i>Odonthestes argentinensis</i> (M)	0,050	180	3,60	Montserrat y col., 2001
<i>Odonthestes bonaeriensis</i> (D)	0,040	260	6,50	Montserrat y col., 2002
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (D)	0,085	266.0	3,13	Shaonan y col., 2004
<i>Oreochromis niloticus</i> (D)	0,102	229,3	2,25	Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004.

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

K_m viene expresado en mM; V_{max} en nmol/min/mg proteínas; V_{max}/K_m en mL/min/mg proteínas.

Tabla 5.1. Continuación. Valores de K_m , V_{max} , V_{max}/K_m usando el sustrato ASCh para el tejido cerebral.

Especie	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	Referencias
<i>Oreochromis niloticus</i> (D)	0,105	-		Filho y col., 2004
<i>Ortopristis ruber</i> (M)	0,273	-		Filho y col., 2004
<i>Pagrus pagrus</i> (M)	0,115	-		Filho y col., 2004
<i>Paralichthys brasiliensis</i> (M)	0,209	-		Filho y col., 2004
<i>Percophis brasiliensis</i> (M)	0,104	-		Filho y col., 2004
<i>Piaractus mesopotamicus</i> (D)	0,085	-		Filho y col., 2004
<i>Prochilodus lineatus</i> (D)	0,312	-		Filho y col., 2004
<i>Pseudorasbora parva</i> (D)	0,113	490.2	4,34	Shaonan y col., 2004
<i>Sparus aurata</i> (M)	0,16 ± 0,01	243,09 ± 2,76	1,52	Presente estudio

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

K_m viene expresado en mM; V_{max} en nmol/min/mg proteínas; V_{max}/K_m en mL/min/mg proteínas.

Tabla 5.2. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la actividad de las ChE musculares de diferentes especies de peces.

Especie	Sustrato						Referencias
	ASCh			BSCh			
	K _m	V _{max}	V _{max} /K _m	K _m	V _{max}	V _{max} /K _m	
<i>Aphanius iberus</i> (M)	0,30	50,78	0,169				Varò y col., 2008
<i>Haemulon plumieri</i> (M)	1,01	198,8	0,197	3,31	85,76	0,026	Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008
<i>Limanda yokohamae</i> (M)	0,18		-	0,07		-	Jung y col., 2007
<i>Oreochromis niloticus</i> (D)	0,50	410,8	0,822	0,12	224,2	1,868	Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004
<i>Pleuronectes vetulus</i> (M)	3,12	343,5	0,110	1,20	109,0	0,091	Rodríguez-Fuentes y col., 2008
<i>Sparus aurata</i> (M)	0,24±0,02	32,21±0,89	0,134	0,16±0,01	16,07±0,56	0,100	Presente estudio

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

K_m viene expresado en mM; V_{max} en nmol/min/mg proteínas; V_{max}/K_m en mL/min/mg proteínas.

5. 2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BASAL Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

El estudio realizado en la dorada demostró que la actividad colinesterasa cerebral disminuye con la edad, encontrándose que los individuos de menor edad (menor longitud y peso corporal) poseían una mayor actividad enzimática mientras que en aquellos ejemplares de mayor edad (mayor longitud y peso corporal) la actividad enzimática era menor. Estudios previos indican que la actividad colinesterasa basal en el cerebro de diversos peces difiere en función del tamaño corporal y de la edad, existiendo relaciones inversas estadísticamente significativas entre la actividad colinesterasa medida en el cerebro y variables como la longitud, peso corporal y peso cerebral. Así, se ha encontrado que la actividad ChE cerebral disminuye con la edad (Napierska y Podolska, 2003) y al aumentar la longitud corporal en diversas especies como *Oncorhynchus mykiss* (Zinkl y col., 1987), *Lepomis macrochirus* (Beauvais y col., 2002), *Leuciscus cephalus* (Flammarion y col., 2002), *Stizostedion vitreum* (Phillips y col., 2002), *Oreochromis niloticus* (Chandrasekara y Pathiratne, 2007; Pathiratne y col, 2008), *Pagrus pagrus*, *Porichthys porosissimus* y *Percophis brasiliensis* (Oliveira y col., 2007). De la misma manera, se encontró una correlación inversa entre el peso y la actividad ChE cerebral de *Lepomis lucius* y *Pimephales promelas* (Weiss, 1958), *Tilapia mossambica* (Rath y Misra, 1981) y *Oreochromis niloticus* (Pathiratne y col, 2008), así como entre el peso cerebral y la actividad ChE cerebral en *Micropterus salmoides*, *Lepomis macrochirus*, *Notemigonus crysoleucas* y *Carassius auratus* (Weiss, 1961).

Por otra parte, se ha comprobado que la actividad ChE muscular estaba inversamente relacionada con la longitud corporal en *Gasterosteus aculeatus* (Sturm y col., 1999) y *Pleuronectes vetulus* (Rodríguez-Fuentes y col., 2008). Asimismo, Kirby y col. (2000) encontraron una correlación débil entre la ChE muscular y factores como el tamaño, sexo, índice gonadosomático, índice hepatosomático y factor de condición en *Platichthys flesus*. Sin embargo, Alpuche-Gual y Gold-Bouchot (2008) no encontraron una correlación significativa entre la actividad ChE muscular y factores como el peso y la longitud en el pez *Haemulon plumieri*. Lundin (1962) indica que la relación entre la ChE muscular y la longitud corporal es coherente con varios supuestos simples: la longitud celular es proporcional a la longitud corporal y al radio de las células musculares, la actividad colinesterasa es proporcional a la superficie celular, la densidad celular es mayor en los peces pequeños que en los grandes; por lo tanto, es

posible relacionar inversamente la actividad colinesterasa con la longitud corporal del ejemplar.

Teniendo en cuenta los estadísticos correspondientes de los ajustes del tipo lineal y del tipo potencial a nuestros datos experimentales, cabe indicar que en general el mejor ajuste se obtuvo tomando la función del tipo potencial $y = ax^b$. A partir de los estadísticos de este modelo, encontramos que la longitud y el peso corporal explicaban, con un alto grado de significación, los valores de actividad colinesterasa en cerebro y músculo. Sin embargo, mientras que el valor de longitud y peso corporal explican la variabilidad de la AChE muscular en porcentajes que superan el 82%, para el caso de la actividad AChE cerebral y BChE muscular los porcentajes descienden hasta menos del 18%. Con el modelo potencial, las relaciones entre la AChE (cerebral y muscular) y el peso alcanzaron coeficientes de correlación más altos que los obtenidos para las relaciones entre la AChE y la longitud. Por el contrario, teniendo en cuenta las ecuaciones de regresión lineal, se obtuvieron coeficientes mayores en todos los casos para la asociación ChE-longitud corporal. De forma similar a lo obtenido por nosotros en *Sparus aurata*, Flammarion y col. (2002) hallaron que la regresión entre el ln (ChE) en músculo de *Leuciscus cephalus* (actividad medida sobre ASCh) y el ln (longitud) mostró un coeficiente de determinación más alto ($R^2=0,62$) que la regresión entre las variables originales ($R^2=0,51$). De igual manera, Pathiratne y col. (2008) reseñaron que las relaciones entre la longitud y el peso corporal de *Oreochromis niloticus* y la actividad ChE (medida sobre ASCh) son curvilíneas tanto en músculo como en cerebro, obteniendo relaciones altamente significativas cuando se ajustan los valores experimentales a una ecuación potencial. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, estos autores obtuvieron altos coeficientes de correlación ($r \geq 0,880$) entre el tamaño y la actividad ChE, tanto en músculo como en cerebro. Además, las relaciones entre la actividad ChE y la longitud corporal tenían valores del coeficiente de correlación comparativamente mayores que las relaciones entre la actividad ChE y el peso corporal. Sturm y col. (1999) encontraron en *Gasterosteus aculeatus* una relación lineal negativa altamente significativa de la ChE muscular (medida sobre ASCh) con la longitud y el peso corporal, con coeficientes de determinación de 0,446 y 0,680, respectivamente. Finalmente, según Rodríguez-Fuentes y col. (2008) la actividad ChE muscular en *Pleuronectes vetulus* presentó un coeficiente negativo significativo con la longitud corporal ($r=-0,3271$, $p=0,011$), aunque el modelo de regresión lineal explicaba solo un 10,75% de la variabilidad.

5. 3. ENSAYOS DE INHIBICION CON ORGANOFOSFORADOS

5. 3. 1. ENSAYOS *in vitro*

La determinación de los valores de la constante de inhibición molecular para la inhibición de las colinesterasas presentes en un organismo por un organofosforado es especialmente importante, ya que es una medida del grado en el que un oxón se une a la enzima y de la potencia de la inhibición de ésta. Un objetivo de este trabajo fue caracterizar la cinética de inhibición de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de la dorada por cuatro insecticidas organofosforados de distinta estructura, lo cual podría ofrecer una mejor comprensión de la sensibilidad de esta especie a este tipo de compuestos.

Según los valores de la constante k_i y de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) predicha a partir de aquélla, la tendencia en orden creciente de potencia inhibitoria de la AChE cerebral de la dorada es: ometoato < diclorvos < paraoxón < azinfosmetil-oxón. Esa misma tendencia, observada también para la inhibición de la AChE muscular de esta especie, es coincidente con la descrita para la AChE del órgano eléctrico de la anguila eléctrica (Herzsprung y col., 1992). Sin embargo, esta tendencia relativa es bastante variable en función de la especie de que se trate. Las constantes de inhibición bimolecular (k_i) encontradas en la bibliografía para los cuatro OF estudiados en peces y otros vertebrados se recogen en las Tablas 5.3 y 5.4, respectivamente. En las Figuras 5.2 a 5.5 se encuentran representados dichos valores, incluyéndose en ellas, con fines comparativos, los valores correspondientes a la inhibición de la AChE purificada de *Drosophila melanogaster*, la mosca del vinagre, que oscilaban entre $21,72 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ para ometoato y $66000 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ para azinfosmetil-oxón (Charpentier y col., 2000).

Teniendo en cuenta los datos encontrados en la literatura, se deduce que la AChE cerebral de la dorada es menos sensible a la inhibición por azinfosmetil-oxón (Figura 5.2) y paraoxón (Figura 5.5) y más sensible a la inhibición por diclorvos (Figura 5.4) que la AChE de rata, sin embargo presenta una sensibilidad similar a la enzima presente en cerebro de otros peces. Las diferencias en las k_i (y CI_{50}) de estos compuestos entre distintas especies pueden ser debidas, en gran parte, a diferencias interespecíficas en la constante de disociación y en la velocidad de fosforilación de la AChE (Wang y Murphy, 1982; Johnson y Wallace, 1987).

Para la AChE cerebral, la constante de disociación (K_d) varió entre 0,656 μM para azinfosmetil-oxón y 5837,1 μM para ometoato (rango de 9000 veces). Sin embargo, la constante de velocidad de fosforilación (k_p) varió solo en un orden de magnitud a pesar de que la constante de inhibición bimolecular (k_i) lo hizo en un rango de tres órdenes de magnitud. Los valores de k_p para esta enzima de los cuatro compuestos estudiados (entre 0,717 y 5,09 min^{-1}) se encuentran próximos a los de la fosforilación de la AChE presente en cerebro de rata por paraoxón (Kemp y Wallace, 1990; Carr y Chambers, 1996) y en el mismo rango de los observados para la inhibición de la AChE cerebral de diversos peces neotropicales por metilparaoxón (0,20-2,13 min^{-1}). La comparación de la cinética de inhibición de la AChE en cerebro de distintas especies revela que existen diferencias substanciales en sus propiedades catalíticas. Por una parte, se ha observado que K_d (y no k_p) es el determinante principal de las diferencias en la potencia inhibidora de los OF para la AChE aislada de diversas fuentes, tales como eritrocitos de bovino, anguila eléctrica o cerebro de mono, cobaya, rata, gallina, conejo, rana y algunos peces (Main y Iverson, 1966; Chiu y col., 1969; Andersen y col., 1977; Wang y Murphy, 1982; Forsberg y Puu, 1984; Gray y Dawson, 1987; Kemp y Wallace, 1990; Filho y col., 2004). Concretamente, la mayor sensibilidad del bagre, *Ictalurus punctatus*, al clorpirifos en relación con el paratión fue atribuida al hecho de que la K_d para el clorpirifos-oxón estimada para la AChE cerebral fue 41 veces menor que para el paraoxón, sin que se encontraran diferencias significativas en los respectivos valores k_p (Carr y Chambers, 1996). También la unión del metilparaoxón a los lugares activos de la AChE de diversos peces neotropicales dependió más de la complejación enzima-inhibidor que de una fosforilación efectiva. Según Kemp y Wallace (1990), esto sugiere que la asociación del inhibidor en el sitio esteárico de la AChE es el principal factor que determina la potencia de series homólogas de organofosfatos. Una vez que se forma el complejo, la fosforilación procede rápidamente y es independiente del inhibidor específico. Esta interpretación lleva implícito que existe un fuerte nucleófilo en el lugar activo de la AChE de estas especies y que es el único determinante del ataque nucleófilo sobre el grupo fosforilo, siendo k_p independiente de las propiedades electrónicas del inhibidor. La arquitectura de los dominios de la AChE, como el sitio aniónico periférico y los anillos de residuos aromáticos (garganta catalítica), puede explicar la afinidad de la AChE (K_d) de estos peces por los oxo-análogos de los plaguicidas fosforotioatos (Wallace y Kemp, 1991). Por consiguiente, tal como sugiere Filho y col. (2004), para analizar mejor la susceptibilidad a los organofosforados, sería necesario conocer la secuencia de aminoácidos de una amplia gama de peces.

Por el contrario, la inhibición de la AChE del cerebro de trucha por diferentes inhibidores varió en función de k_p (Kemp y Wallace, 1990), sin que K_d fuese significativamente diferente para los compuestos individuales, a pesar de que existía una diferencia de unas 4000 veces entre las k_i respectivas. Según estos autores, esta dependencia de k_p sugiere, que a diferencia del cerebro de rata o gallina, la AChE cerebral de trucha posee un nucleófilo bastante débil dentro del sitio esteárico, siendo la fosforilación de la enzima proporcional a la acidez del grupo fosforilo del inhibidor.

Herzsprung y col. (1992) realizaron un amplio estudio en el que determinaron las constantes k_i de 55 insecticidas organofosforados y carbamatos sobre AChE de anguila eléctrica, AChE eritrocitaria bovina, BChE de suero humano y BChE de suero de caballo. Dependiendo de su estructura (grupo I o II, Figura 5.1), formularon algunas reglas generales para la inhibición de estas colinesterasas por los compuestos organofosforados: 1) los organofosforados con grupos dietoxi inhiben la BChE más que la AChE, 2) los sustituyentes grandes unidos al sistema aromático (compuestos grupo I) provocan una disminución de la sensibilidad para la AChE y un aumento de sensibilidad para la BChE, y 3) los compuestos organofosforados del grupo II con grupos dimetoxi inhiben la AChE en mayor medida que la BChE.

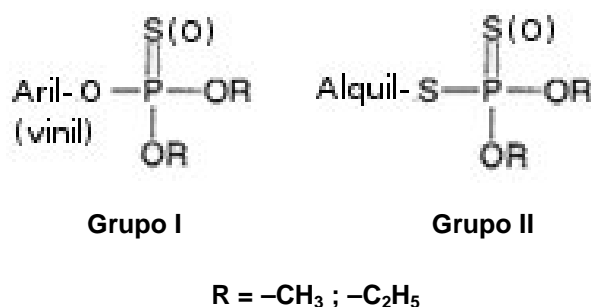


Figura 5.1. Estructura química de la mayoría de los insecticidas organofosforados.

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio, se evidenció que no solo paraoxón (OF del grupo I con grupos dietoxi), sino también diclorvos (OF del grupo I con grupos metoxi) y ometoato (OF del grupo II con grupos metoxi) inhibieron la BChE muscular en mucha mayor medida que la AChE cerebral y muscular de *Sparus aurata* (2-4 órdenes de magnitud). En el caso del azinfosmetil-oxón (OF del grupo II con grupos metoxi) solo la AChE muscular mostró una sensibilidad ligeramente menor que la BChE muscular, mientras que ésta mostró una sensibilidad mayor que la AChE cerebral (~doble). Estos resultados coinciden con los publicados por Sturm y col. (1999) para las colinesterasas de tejido cerebral y muscular de tres teleósteos marinos (*Limanda limanda*, *Platichthys flesus* y *Serranus cabrilla*). En efecto, las constantes de inhibición bimolecular para paraoxón (rango de $1,2$ a $8,3 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y diclorvos (rango de $7,3 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de la BChE muscular de estas especies fueron tres órdenes de magnitud superiores a los respectivos valores k_i de las AChE (cerebro y músculo). Por el contrario, los valores k_i de AChE y BChE de diferentes fuentes en mamíferos (Herzsprung y col., 1992) son mucho más similares entre sí (dentro de un orden de magnitud) para los cuatro OF estudiados en este trabajo. Por todo ello, Sturm y col. (1999) han postulado que la marcada diferencia de sensibilidad entre AChE y BChE en peces, al menos para ciertos inhibidores, puede ser útil en la identificación de los compuestos responsables y en la monitorización de xenobióticos en el medio marino.

Se tienen referencias anteriores de la sensibilidad extremadamente alta de la BChE de ciertos peces, sugiriéndose el posible uso de la BChE purificada de peces para detectar plaguicidas en muestras ambientales (Magnotti y col., 1994). El valor de k_i , $2,3 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, del paraoxón para la BChE de dos serránidos recalculado por Sturm y col. (1999) a partir de la CI_{50} obtenida por Magnotti y col. (1994), se encuentra próximo a los descritos para los teleósteos marinos estudiados por ellos, mientras que es menor para dos pleuronéctidos ($4,6 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Según los resultados obtenidos en nuestro estudio para la constante de disociación bimolecular, se deduce que la sensibilidad a este compuesto de la BChE muscular de la dorada (espárido) es similar ($1,49 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a la de todos los teleósteos anteriormente citados. Comparativamente, diclorvos mostró una potencia inhibidora alta de esta enzima ($1,31 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente), similar a la del paraoxón, mientras que fue intermedia para el azinfosmetil-oxón ($2,08 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y menor para el ometoato ($122,3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Es de destacar que para todos los compuestos ensayados la sensibilidad de la BChE muscular de la dorada es notablemente superior a la

sensibilidad de la BChE de mamíferos. La mayor sensibilidad de la BChE muscular frente a la AChE puede sugerir que, tras una exposición a plaguicidas de este tipo, una inhibición de la BChE más o menos completa podría anticiparse a la inhibición de la AChE. Sin embargo, los efectos de los OF pueden ser modificados por diversos factores fisiológicos, por lo que no pueden predecirse basándose solamente en los estudios *in vitro*. A excepción del diclorvos, los demás compuestos estudiados necesitan sufrir una activación metabólica y convertirse en sus oxo-análogos para poder inhibir a las enzimas ChE. Esta bioactivación parece estar catalizada principalmente por el citocromo P-450 del hígado (Boone y Chambers, 1997). Además, los OF pueden ser destoxificados por diferentes enzimas como el citocromo P-450, A-esterasas y carboxilesterasas. De todas formas, si se produce finalmente el contacto entre los organofosforados o sus metabolitos con las enzimas presentes en el músculo, es presumible que existan importantes diferencias de inhibición entre la AChE y BChE. Por último, destacar que la función de la BChE en peces no se conoce en profundidad (Magnotti y col., 1994), bien es cierto que en vertebrados superiores una función de la BChE es proteger a la AChE capturando a los inhibidores de la ChE (Massoulié y col., 1993). La mayor sensibilidad de la BChE muscular frente a la AChE para ciertos organofosforados en las pocas especies de peces investigadas (Sturm y col., 1999; Sturm y col., 2000; este estudio) sugiere que la BChE puede tener una función protectora similar en peces.

Tabla 5.3. Tabla resumen de las constantes cinéticas de inhibición bimolecular ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) para las colinesterasas de diversos peces.

OF	Organismo	Enzima	Tejido	k_i	Referencia
Azinfosmetil-oxón	<i>Electrophorus electricus</i> (D)	AChE	órgano eléctrico	6000	Herzsprung y col., 1992
	<i>Ictalurus punctatus</i> (D)	AChE	cerebro	1133	Wang y Murphy, 1982
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	cerebro	1122,7	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	músculo	2419,6	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	BChE	músculo	2084,4	Presente estudio
Díclorvos	<i>Electrophorus electricus</i> (D)	AChE	órgano eléctrico	42	Herzsprung y col., 1992
	<i>Limanda limanda</i> (M)	AChE	cerebro	11	Sturm y col., 1999
	<i>Limanda limanda</i> (M)	AChE	músculo	8,9	Sturm y col., 1999
	<i>Limanda limanda</i> (M)	BChE	músculo	$2,6 \times 10^4$	Sturm y col., 1999
	<i>Pleuronectes flesus</i> (M)	AChE	cerebro	11	Sturm y col., 1999
	<i>Pleuronectes flesus</i> (M)	AChE	músculo	8,9	Sturm y col., 1999
	<i>Pleuronectes flesus</i> (M)	BChE	músculo	$2,4 \times 10^4$	Sturm y col., 1999
	<i>Serratus cabrilla</i> (M)	AChE	cerebro	9,9	Sturm y col., 1999
	<i>Serratus cabrilla</i> (M)	AChE	músculo	7,3	Sturm y col., 1999
	<i>Serratus cabrilla</i> (M)	BChE	músculo	$8,1 \times 10^4$	Sturm y col., 1999
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	cerebro	7,8	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	músculo	8,1	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	BChE	músculo	$13,2 \times 10^4$	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	BChE	músculo	$14,9 \times 10^4$	Presente estudio

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

Tabla 5.3. Continuación. Tabla resumen de las constantes cinéticas de inhibición bimolecular ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) para las colinesterasas de diversos peces.

OF	Organismo	Enzima	Tejido	k_i	Referencia
Ometoato	<i>Electrophorus electricus</i> (D)	AChE	órgano eléctrico	2,6	Herzsprung y col., 1992
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	Cerebro	0,8	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	músculo	2,05	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	BChE	músculo	107,9	Presente estudio
Paraoxón	<i>Electrophorus electricus</i> (D)	AChE	órgano eléctrico	220	Herzsprung y col., 1992
	<i>Ictalurus punctatus</i> (D)	AChE	cerebro	109	Wang y Murphy, 1982
	<i>Ictalurus punctatus</i> (D)	AChE	cerebro	$30,6 \pm 2,7$	Carr y Chambers, 1996
	<i>Limanda limanda</i> (M)	AChE	cerebro	74	Sturm y col., 1999
	<i>Limanda limanda</i> (M)	AChE	músculo	23	Sturm y col., 1999
	<i>Limanda limanda</i> (M)	BChE	músculo	$8,9 \times 10^4$	Sturm y col., 1999
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (D)	AChE	Cerebro	$0,375 \pm 0,030$	Kemp y Wallace, 1990
	<i>Pleuronectes flesus</i> (M)	AChE	cerebro	83	Sturm y col., 1999
	<i>Pleuronectes flesus</i> (M)	AChE	músculo	21	Sturm y col., 1999
	<i>Pleuronectes flesus</i> (M)	BChE	músculo	$8,7 \times 10^4$	Sturm y col., 1999
	<i>Serratus cabrilla</i> (M)	AChE	cerebro	12	Sturm y col., 1999
	<i>Serratus cabrilla</i> (M)	AChE	músculo	13	Sturm y col., 1999
	<i>Serratus cabrilla</i> (M)	BChE	músculo	$8,5 \times 10^4$	Sturm y col., 1999
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	cerebro	10,8	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	AChE	músculo	224,8	Presente estudio
	<i>Sparus aurata</i> (M)	BChE	músculo	$14,9 \times 10^4$	Presente estudio

M: especie marina. D: especie de agua dulce.

Tabla 5.4. Tabla resumen de las constantes cinéticas de inhibición bimolecular ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) para las colinesterasas de diversos mamíferos.

Compuesto	Organismo	Enzima	Tejido	k_i	Referencia
Azinfosmetil-oxón	rata	AChE	cerebro	1804	Wang y Murphy, 1982
	Bovino	AChE	eritrocitos	900	Herzsprung y col., 1992
	Hombre	BChE	suero	15	Herzsprung y col., 1992
	Caballo	BChE	suero	270	Herzsprung y col., 1992
Diclorvos	Rata	AChE	cerebro	1,4	Maxwell, 1992
	Bovino	AChE	eritrocitos	23	Herzsprung y col., 1992
	Hombre	BChE	suero	230	Herzsprung y col., 1992
	Caballo	BChE	suero	80	Herzsprung y col., 1992
Ometoato	Rata	AChE	Cerebro	2,1	Sanderson y Edson, 1964*
	Bovino	AChE	eritrocitos	0,9	Herzsprung y col., 1992
	Hombre	BChE	suero	0,08	Herzsprung y col., 1992
	Caballo	BChE	suero	0,1	Herzsprung y col., 1992
Paraoxón	rata	AChE	cerebro	1760	Wang y Murphy, 1982
	rata	AChE	cerebro	$854,7 \pm 33,0$	Carr y Chambers, 1996
	rata	AChE	Cerebro	1463 ± 29	Kemp y Wallace, 1990
	rata	AChE	Cerebro	$900 \pm 1,1$	Maxwell, 1992
	Bovino	AChE	eritrocitos	600	Herzsprung y col., 1992
	Hombre	BChE	suero	1500	Herzsprung y col., 1992
	Caballo	BChE	suero	800	Herzsprung y col., 1992

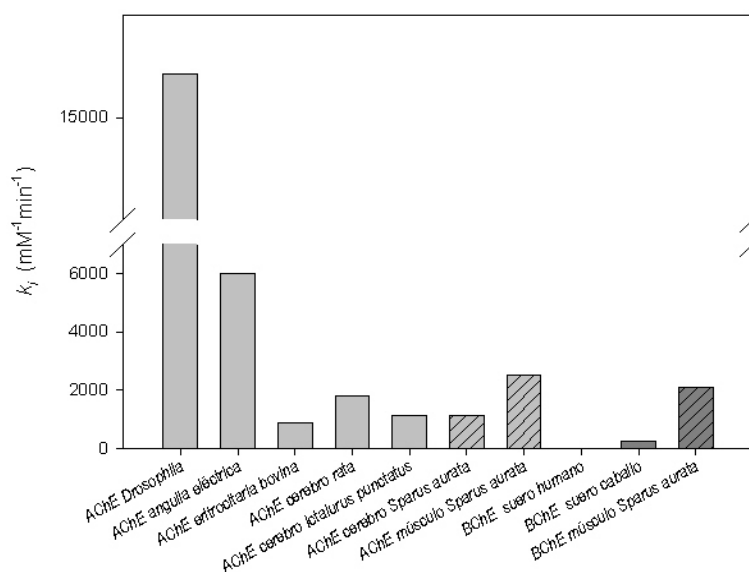


Figura 5.2. Comparación de las constantes de inhibición bimolecular (k_i) del azinfosmetil-oxón para las colinesterasas de diversas especies.

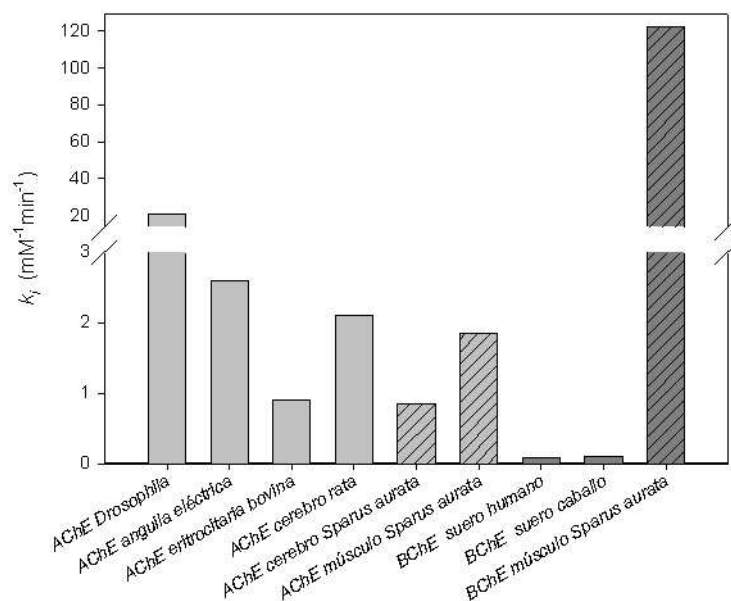


Figura 5.3. Comparación de las constantes de inhibición bimolecular (k_i) del ometoato para las colinesterasas de diversas especies.

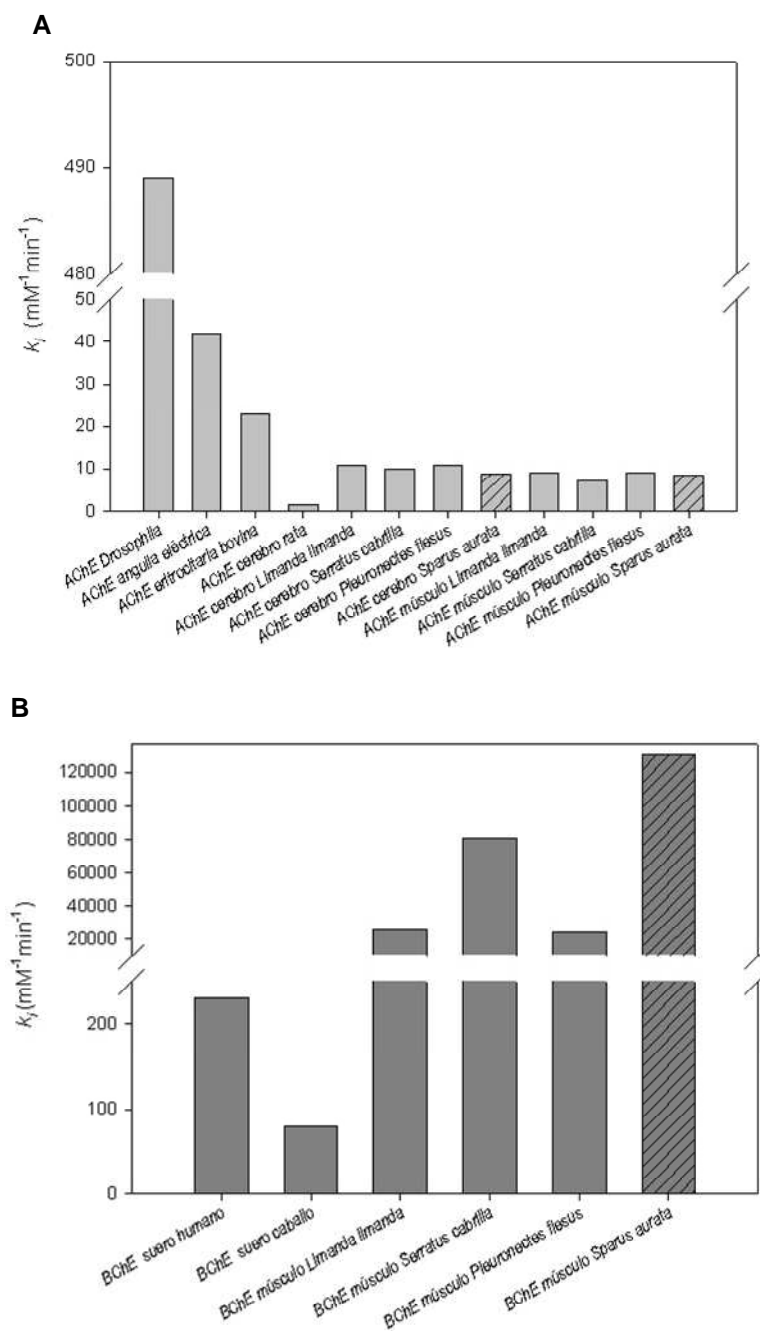


Figura 5.4. Comparación de las constantes de inhibición bimolecular (k_i) del diclorvos para (A) acetilcolinesterasas y (B) butirilcolinesterasas de diversas especies.

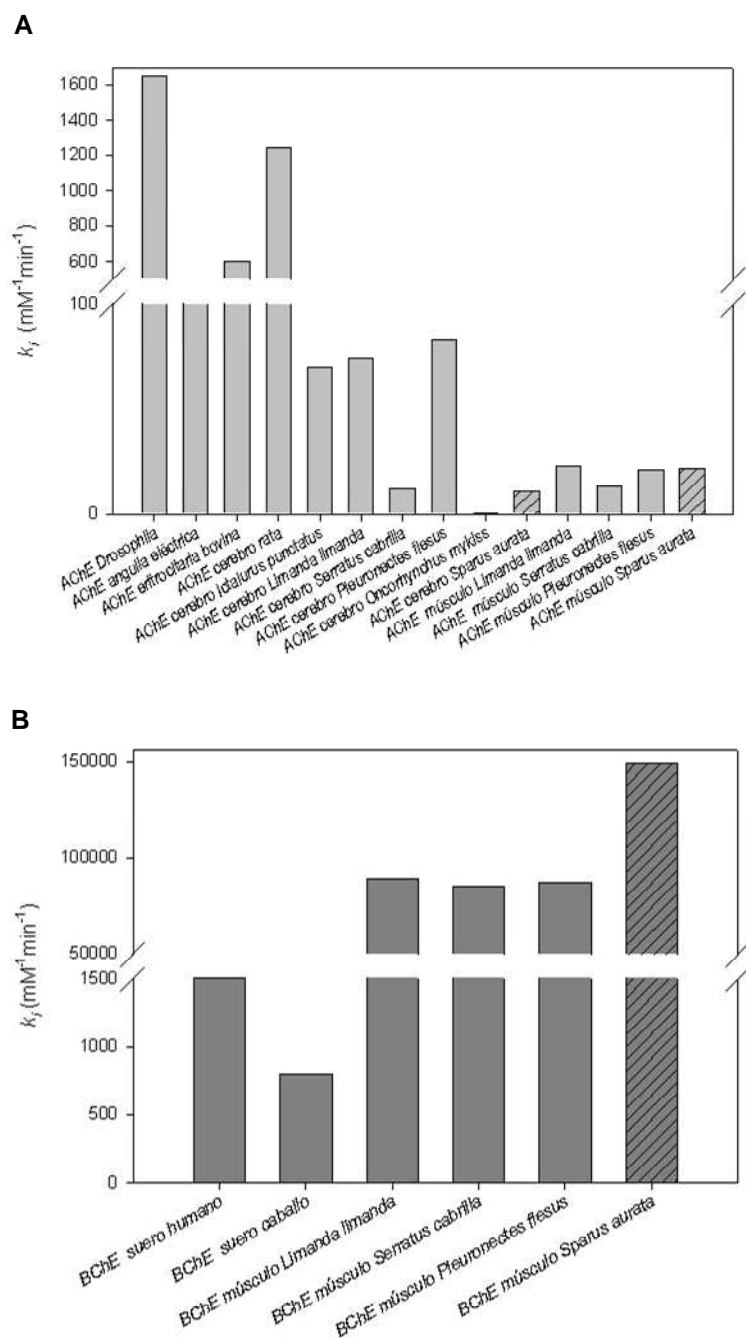


Figura 5.5. Comparación de las constantes de inhibición bimolecular (k_i) del paraoxón para (A) acetilcolinesterasas y (B) butirilcolinesterasas de diversas especies.

5. 3. 2. ENSAYOS *in vivo*

En la Tabla 5.5 se recogen valores de CL₅₀-24 h para distintas especies de peces de los plaguicidas organofosforados objeto de este trabajo, recopilados en la base de datos ECOTOX (USEPA, 2007b).

Tabla 5.5. Concentraciones letales medias (CL₅₀-24h)* de los plaguicidas objeto de estudio para diversas especies de peces recogidas en la base de datos ECOTOX

Especies	Azinfosmetil CL ₅₀ -24h (mg/L)	Diclorvos CL ₅₀ -24h (mg/L)	Dimetoato CL ₅₀ -24h (mg/L)	Paratión CL ₅₀ -24h (mg/L)
<i>Carassius auratus</i> (D)	2,40-11,20	-	-	2,70-4,83
<i>Cyprinodon variegatus</i> (M)	-	-	-	0,065
<i>Cyprinus Carpio</i> (D)	1,24	9,44-20,0	4,23-4,62	2,09-2,10
<i>Danio rerio</i> (D)	-	-	100	5,64
<i>Esox lucius</i> (D)	0,00067	-	-	-
<i>Fundulus heteroclitus</i> (M)	-	3,41	-	-
<i>Gambusia affinis</i> (D)	-	17,8	-	0,085-1,40
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (M)	0,007-0,016	-	-	-
<i>Heteropneustes fossilis</i> (D)	-	8,13	5,14-12,13	-
<i>Ictalurus punctatus</i> (D)	3,90-4,53	-	-	4,90
<i>Leiostomus xanthurus</i> (M)	-	1,00	-	-
<i>Lepomis cyanellus</i> (D)	0,13	-	-	0,155-3,60
<i>Lepomis macrochirus</i> (D)	0,011-0,15	0,87-3,08	28,00	0,066-3,00
<i>Menidia menidia</i> (M)	0,0014	5,70-9,60	-	-
<i>Oncorhynchus kisutch</i> (D)	0,004-0,023	-	-	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (D)	0,005-0,026	0,50	11,20-133,0	0,78-2,03
<i>Pimephales promelas</i> (D)	0,141-13,7	23,0	-	1,60-5,00
<i>Poecilia reticulata</i> (D)	0,37-1,80	5,81	25,29-620	0,05-0,08

* Se recogen los valores tabulados mínimo y máximo
- M: especie marina; D: especie de agua dulce.

Tal como se resume en la Tabla 5.6, en general, el orden de toxicidad en los peces de estos insecticidas es: azinfosmetil>paratión>diclorvos>dimetoato. Este orden de toxicidad es coincidente con el obtenido por nosotros en *Sparus aurata* teniendo en cuenta la potencia inhibidora de los correspondientes oxones sobre la AChE cerebral y muscular en los ensayos *in vitro* (valores de k_i y CI_{50} , Tabla 4.7), así como las DE_{50} para la inhibición de la AChE cerebral obtenidas para el azinfosmetil (1,74 mg/kg), paratión (5,53 mg/kg) y dimetoato (16,20 mg/kg) administrados por vía i.p. Sin embargo, en la rata, teniendo en cuenta la DL_{50} por vía oral y por vía i.p., el orden de toxicidad es: paratión>azinfosmetil>diclorvos>dimetoato (Tabla 3.3).

Tabla 5.6. Resumen de la toxicidad aguda de los plaguicidas objeto de estudio sobre los peces (PAN Pesticides Database) [<http://www.pesticideinfo.org/>]

Compuesto	Toxicidad media	Rango de toxicidad
Azinfosmetil	Altamente tóxico	Toxicidad moderada-muy alta
Diclorvos	Moderadamente tóxico	Toxicidad ligera-alta
Dimetoato	Ligeramente tóxico	No tóxico-toxicidad muy alta
Paratión	Moderadamente tóxico	Toxicidad moderada-muy alta

Esta diferente sensibilidad relativa entre la rata y la dorada respecto al paraoxón y el azinfosmetil-oxón es concordante con lo reseñado por Murphy y col. (1968) en un estudio con diferentes especies de mamíferos, aves y peces, en el que concluyeron que para el paraoxón el orden de mayor a menor sensibilidad *in vitro* fue aves>mamíferos>peces, mientras que para el azinfosmetil-oxón, el orden fue peces>mamíferos>aves. La misma toxicidad relativa fue encontrada en estudios *in vivo* en los que los tiofosfatos parentales (paratión y azinfosmetil) de los anteriores metabolitos fueron aplicados por vía intraperitoneal. Esta vía de administración fue elegida por estos autores al considerar que representa el método más conveniente para exponer en todas las especies estudiadas superficies de absorción similares. Asimismo, esta vía de exposición ha resultado útil para comprobar si diferencias apreciables en los valores de CL_{50} para una especie acuática pueden ser debidas a diferencias en la absorción de los insecticidas desde el agua (Benke et al., 1974). Si fuese ese el caso, las diferencias desaparecerían o se reducirían al administrar parenteralmente los compuestos a los peces.

En experimentos con *Gambusia affinis* utilizando metilparatión, paratión y clorpirifos, también se comprobó una correspondencia entre las potencias de los tres oxones como inhibidores de la AChE cerebral y el nivel de toxicidad del insecticida parental, sin embargo, no se observó una correspondencia en el metabolismo de los insecticidas (Boone y Chambers, 1997). Diversos autores (Chambers y col., 1994; Ma y Chambers, 1995; Chambers y Carr, 1995) han manifestado que los niveles de toxicidad aguda de los insecticidas organofosforados en los mamíferos, a diferencia de los peces, están más determinados por las diferencias en la eficacia metabólica que por las diferencias en la sensibilidad de las enzimas blanco.

En las especies *Lepomis gibbosus* e *Ictalurus melas* estudiados por Murphy y col. (1968) una dosis de paratión de 15 mg/kg administrada por vía i.p. produjo una inhibición del 0 y del 10% en la AChE cerebral, respectivamente, transcurridas 2 horas tras el tratamiento. Similarmente, en la dorada, una dosis de paratión de 7,5 mg/kg por la misma vía redujo la actividad de dicha enzima un 7,2% respecto a los controles a las tres horas de la administración. En el caso del azinfosmetil, una dosis de 4 mg/kg en *L. gibbosus* y de 8 mg/kg en *I. melas* produjeron una inhibición del 14% y del 27% de la AChE cerebral, respectivamente, después de 2 h tras la administración por vía i.p. Asimismo, una dosis de 16 mg/kg en ambas especies redujo la actividad un 76 y un 57%, respectivamente. En nuestro estudio, una dosis cuatro veces inferior (4 mg/kg) produjo a las 3 h de la administración una mayor inhibición, llegando a alcanzarse valores del 80,6% de la actividad AChE en el cerebro de la dorada.

Hay que hacer notar que el trabajo de Murphy et al. (1968) está realizado bajo condiciones de tiempo muy limitadas, por lo que, tal como apuntaron, la falta de depresión en los niveles de colinesterasa en *Lepomis gibbosus* incluso con dosis de 40 mg/kg por vía i.p. de paratión se debe a que ha transcurrido un tiempo insuficiente para que se formen cantidades adecuadas del metabolito activo paraoxón. La cantidad relativa de los oxo análogos que se acumulan y están disponibles para inhibir la colinesterasa dependerá (al menos en parte) de la velocidad relativa de su formación a partir del compuesto parental y la velocidad relativa de degradación metabólica de los compuestos P=O o P=S por las hidrolasas tisulares u otros mecanismos de inactivación. Queda claro en nuestro estudio que en la dorada el comienzo de la acción tóxica del azinfosmetil es más rápida que en el caso del paratión (Figura 5.6.A). Así, la máxima inhibición de la colinesterasa cerebral ocurrió a las 9 h tras una dosis subletal de azinfosmetil, mientras que en el caso del paratión, el valor mínimo de

actividad se obtuvo a las 48 h, aunque a partir de las 24 horas y hasta las 168 h las diferencias entre las medias no fueron significativas (Tabla 4.13).

Varó y col. (2007) en un estudio con juveniles (~0,3 g) de *Sparus aurata* expuestos a 0,025, 0,05 y 0,1 mg/L durante 24 h, obtuvieron una reducción del 41% y del 52% en la ChE de la cabeza a las concentraciones más altas, mientras que la concentración más baja no indujo una inhibición significativa. En un estudio anterior, con juveniles (~5 g) de otra especie marina, *Dicentrarchus labrax*, Varó y col. (2003) obtuvieron resultados similares: una inhibición significativa en la actividad ChE de la cabeza (>35%) tras una exposición aguda a 0,125 mg/L de diclorvos, pero tampoco en este caso encontraron una relación dosis-dependiente en el rango de dosis estudiado. En ninguno de los dos trabajos anteriores se realizó el estudio de la evolución temporal de la inhibición y recuperación de la actividad ChE. Sin embargo, en un estudio posterior, Varó y col. (2008) estudiaron la pauta de inhibición y recuperación en los tejidos de la especie *Aphanius iberus*, propia de la costa este española, tras exposición durante 96 h a una concentración de 1 mg/L (1/3 de la CL₅₀-96 h) y después de otras 96 h de permanencia en agua de mar limpia (período de recuperación). El valor máximo de inhibición de la ChE sobre el sustrato acetilcolina en la cabeza de los peces fue de un 83,1% (hembras) y un 90,8% (machos), mientras que en el músculo, la inhibición alcanzó valores del 79,5% y 82,1% en hembras y machos, respectivamente. Tras 96 h en agua limpia, la actividad enzimática en la cabeza se recuperó hasta el 43,3% y el 44,3% del valor control para hembras y machos, respectivamente. En el músculo, la recuperación de la actividad enzimática fue mayor: hasta el 70,5% del control para las hembras y hasta el 50,5% del control para los machos. En nuestro estudio, tras una inhibición máxima del 57,3% alcanzada a las 3 h tras la administración de 23,3 mg/kg por vía i.p. de diclorvos en la dorada, se recuperó totalmente la actividad enzimática (93,4%) tras 168 h, comprobándose en la comparación entre los grupos control y experimental que las medias no son significativamente diferentes (nivel 0,05).

A pesar de que el dimetoato ha sido detectado en muestras de agua, sedimentos y suelo (Brunetto y col., 1992; El-Kabbany y col., 2000; Sapozhnikova y col., 2004) así como en tejidos de peces (Abou-Arab y col., 1996; Sapozhnikova y col., 2004), y se han publicado estudios sobre su efecto sobre el metabolismo energético (Pant y Singh, 1983; Awasthi y col., 1984), no tenemos referencias de estudios de inhibición de las colinesterasas en estos vertebrados, circunstancia quizás

propiciada por el hecho de que este insecticida se considera ligeramente tóxico para los peces (PAN Pesticides Database, 2008)

Por otro lado, Carr y Chambers (1996) comprobaron que a diferencia de lo observado para la AChE cerebral de la rata, en ensayos con AChE cerebral del pez *Ictalurus punctatus* no se observó una reactivación espontánea de la enzima. Por su parte, Wallace y Herzberg (1988) sugirieron que en la trucha arcoiris la recuperación de la actividad tras exposición a malaoxón y paraoxón depende de la síntesis *de novo* de la AChE. Esta incapacidad de la AChE cerebral de los peces para reactivarse espontáneamente fue apuntada como la probable razón que subyace en la prolongada inhibición de la AChE observada tras la exposición de *Salmo salar* (Morgan y col., 1990), *Ictalurus punctatus* (Carr y col., 1995; Straus y Chambers, 1995), *Gambusia affinis* (Boone y Chambers, 1996) y *Carassius auratus* (Ferrari y col., 2004a) a distintos insecticidas organofosforados. Concretamente en experimentos con la especie *G. affinis*, se ha comprobado una inhibición de la AChE cerebral y muscular durante 6 semanas tras exposición a los insecticidas clorpirifos, paratión y metilparatión (Chambers y col., 2002). Asimismo, tras la exposición durante 96 h a concentraciones subletales de paratión y azinfosmetil (0,001 mg/L), la actividad de la enzima AChE cerebral en *Carassius auratus* requirió más de 35 días para su total recuperación (Ferrari y col., 2004a), mientras que en el caso de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) no se observó una recuperación significativa con azinfosmetil (0,001 mg/L) tras 21 días en agua limpia (Ferrari y col., 2007).

En diversos estudios se ha sugerido que la mortalidad en peces se produce cuando la inhibición de la AChE cerebral alcanza valores entre el 70 y el 90% (Coppage y Matthews, 1974; Zinkl y col., 1991). De acuerdo con esto, en trabajos previos realizados con larvas de dorada en fase de alimentación endógena, hemos observado que larvas expuestas a azinfosmetil y paratión durante 72 h mostraban un 70% de inhibición de la AChE corporal a concentraciones próximas a las CL₅₀ respectivas (Arufe y col., 2007, en prensa). Sin embargo, la relación entre la inhibición de las colinesterasas y la mortalidad no está clara en los peces ya que existen especies para las que una inhibición del 8% fue letal (Weiss, 1958, 1961) mientras que otras son capaces de tolerar niveles de inhibición superiores al 90% (Fulton y Key, 2001; Ferrari y col., 2004a,b). Este último parece ser el caso de la especie *Sparus aurata* ya que en el presente estudio hemos comprobado que, a diferencia de las larvas con saco vitelino, los ejemplares adultos de esta especie fueron capaces de

sobrevivir con valores de inhibición del $91,5 \pm 1,9\%$ (valor máximo en una dorada del 93,2%) a las 9 h tras administración de azinfosmetil. Similares resultados han sido descritos por Ferrari y col. (2004a) quienes apuntaron que la especie *Carassius aurata* fue capaz de sobrevivir tras 96 h de tratamiento con azinfosmetil y paratión (0,1 mg/L) con una inhibición de la AChE cerebral que alcanzó el 90% y el 95%, respectivamente. Igualmente estos autores Ferrari y col. (2004b) señalaron que la actividad residual en la trucha arcoiris llegó a ser menor del 5% del valor control tras exposición durante 96 h a azinfosmetil (0,001 mg/L) sin provocar signos de toxicidad. Coppage (1972) observó que individuos de la especie *Cyprinodon variegatus* que sobrevivieron a concentraciones letales medias de diversos insecticidas organofosforados (entre los que se encuentran azinfosmetil, diclorvos y paratión) presentaban una inhibición de la AChE cerebral mayor del 80%. Asimismo afirmó que dada la variabilidad de los niveles de AChE en los peces control, la actividad debe estar inhibida en más de un 13% para indicar exposición a insecticidas organofosforados. Tal y como indican Fulton y Key (2001) estos hallazgos sugieren que niveles de inhibición de la colinesterasa cerebral del 20 al 70% en peces vivos podrían ser indicativos de exposición a OF. Atendiendo al estudio de Murphy et al. (1968) existen ciertas evidencias de que los peces podrían tolerar mejor que ratones o gallinas niveles de AChE cerebral marcadamente bajos. Según estos autores esto sugiere que deben considerarse factores adicionales en orden a evaluar las toxicidades relativas de insecticidas anticolinesterásicos para diversas especies, como son las velocidades relativas de formación y acumulación de acetilcolina y la susceptibilidad relativa a los efectos letales de un exceso de este neurotransmisor.

En general, para los cuatro organofosforados objeto de este estudio, la AChE muscular de la dorada tiene un comportamiento parecido a la AChE cerebral. Por una parte, el orden de sensibilidad ante los correspondientes oxones en los ensayos *in vitro* es análogo (azinfosmetiloxón>paraoxón>diclorvos>ometoato) y, por otro, tras la administración i.p. de cada OF, la evolución temporal (inhibición y recuperación) durante el período de estudio sigue una pauta similar en ambas enzimas (Figura 4.63-4.66). Además, en las Figuras 5.6.A y 5.6.B se resalta cómo después del declive de la actividad enzimática durante las primeras horas, diferente según el compuesto, en el período de recuperación, y en particular a partir de las 48 h, el perfil de recuperación de la actividad AChE cerebral y muscular es análogo independientemente del compuesto de que se trate. Por el contrario, la BChE muscular se comporta de manera notoriamente diferente. En primer lugar, el orden de sensibilidad ante los

metabolitos activos (paraoxón> diclorvos> azinfosmetil-oxón> ometoato) es distinto al observado para la AChE tisular (azinfosmetil-oxón> paraoxón> diclorvos> ometoato), no existiendo una correlación directa entre la inhibición de la BChE del músculo esquelético por los organofosforados estudiados y la toxicidad aguda observada para estos insecticidas en los peces (Tabla 5.5). En segundo lugar, la depresión de la BChE es notablemente superior ya desde las 3 primeras horas, como en el caso de diclorvos (Figura 4.64) y dimetoato (Figura 4.65) o hacia el final del período de estudio (7 días) como fue observado para el azinfosmetil (Figura 4.63) y el paratión (Figura 4.66). Finalmente, en los tres insecticidas de tipo tiofosfato que necesitan ser bioactivados previamente para ejercer su potencia máxima, la inhibición de la BChE al cabo de 7 días es casi total (media entre el 94,1 y el 97,1%), independientemente de la distinta evolución temporal de la inhibición de la enzima en las etapas previas. En el caso del diclorvos, de acción anticolinesterásica directa, aparece una primera fase de recuperación parcial de la actividad, aunque ésta se estabiliza a partir de las 24 horas.

Al analizar el comportamiento de la BChE muscular en *Sparus aurata*, parece lógico pensar que esta enzima podría suministrar un mecanismo protector frente al impacto tóxico de un compuesto anticolinesterásico en esta especie. A pesar de que en la dorada se ha encontrado un mayor título de AChE en cerebro que de BChE en músculo ($V_{max}=243,09$ nmol/min/mg vs $16,07$ nmol/min/mg), la cantidad de músculo esquelético presente en el animal es mucho mayor que la cantidad de masa cerebral y, por consiguiente, teóricamente, la cantidad de BChE en músculo esquelético presente debería ser mucho mayor que la cantidad de AChE en cerebro. Por lo tanto, considerando que está presente una mayor cantidad de BChE muscular y que, tal como se apuntó en el apartado de resultados, esta enzima en *Sparus aurata* es mucho más sensible a los oxones que la AChE cerebral (azinfosmetil ~doble, ometoato ~100 veces, diclorvos y paraoxón ~ 10^4 veces), es posible que una vez que el inhibidor penetre en el organismo, la BChE del músculo esquelético sufra una fosforilación, capturando al inhibidor y reduciendo así la cantidad disponible de éste para inhibir a la AChE cerebral, más resistente a la inhibición. Durante la exposición a bajas concentraciones del inhibidor, el músculo esquelético podría suministrar un lugar alternativo de fosforilación para el inhibidor, protegiendo de ese modo a los lugares diana del cerebro.

Carr y col. (1997) otorgan este papel protector a la AChE muscular en la especie *Gambusia affinis*, al comprobar que esta enzima es 20 veces más sensible a

la inhibición por clorpirifos-oxón que la AChE cerebral. En las otras especies estudiadas *Micropterus salmoides*, *Lepomis macrochirus* y *Notemigonus crysoleucas*, la diferencia de sensibilidad entre ambas enzimas no es tan acusada, por lo que en estas especies la AChE muscular no sería tan eficiente a la hora de suministrar un lugar alternativo de fosforilación y por lo tanto hay una mayor oportunidad de que el inhibidor alcance y actúe sobre la AChE cerebral. En cualquier caso, los autores apuntan a que el factor más importante que determina las diferencias de toxicidad entre las especies más sensibles (*M. salmoides*, *L. macrochirus* y *N. crysoleucas*) y la más tolerante (*G. affinis*) frente a la exposición al insecticida clorpirifos es la inhibición de la AChE cerebral.

En contraposición, Ferrari y col. (2007) señalan la preponderancia de la inhibición de la ChE muscular frente a la ChE cerebral (medidas ambas sobre ASCh) como principal causa de mortalidad en algunas especies de peces como la trucha arcoiris. Las razones esgrimidas en este caso fueron las siguientes: (a) la ChE del músculo esquelético, que controla la función muscular, es el mayor “pool” de actividad ChE corporal, (b) la actividad ChE específica es también mayor en músculo que en cerebro, (c) concentraciones bajas de plaguicidas que inhiben la ChE cerebral, pero no la muscular, no provocan mortalidad y (d) los valores de CE_{50} para la enzima muscular son mayores que los correspondientes para la enzima cerebral y más próximos a la CL_{50} . Además, en esta especie, la ChE muscular no solo muestra una menor sensibilidad que la cerebral sino una recuperación más lenta tras la exposición a una concentración subletal de azinfosmetil (Ferrari y col, 2004a). A este respecto indican que una velocidad diferente de recuperación puede estar asociada a una tasa diferente de síntesis de proteínas en ambos órganos o relacionada con los “pool” de ChE y aspectos toxicodinámicos.

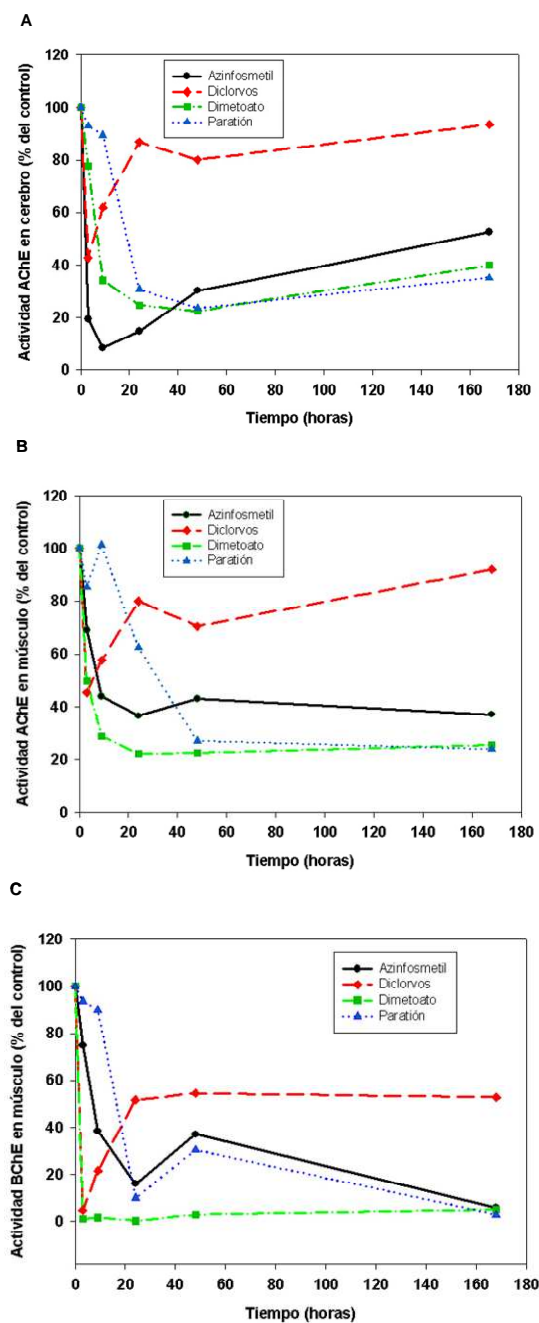


Figura 5.6. Comparación de la evolución temporal de la actividad colinesterasa en cada tejido tras la administración i.p. de los cuatro insecticidas estudiados.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se han podido establecer, entre otras, las siguientes conclusiones:

1. La actividad colinesterasa presente en cerebro de dorada se ha caracterizado como acetilcolinesterasa en base a su especificidad por los sustratos acetiltiocolina y acetyl- β -metiltiocolina y a su alta inhibición con BW284c51.
2. En el músculo de la dorada existe una AChE con propiedades típicas (resistente a iso-OMPA), además de una BChE atípica (sensible a BW284c51).
3. La actividad colinesterasa presente en el plasma de la dorada es muy pequeña frente a todos los sustratos utilizados, por lo que, en esta especie, dicha muestra biológica no se considera adecuada para la determinación de este biomarcador con el objeto de valorar la exposición a compuestos anticolinesterásicos.
4. Del estudio de los parámetros cinéticos, se deduce que la afinidad de la AChE cerebral por el sustrato ASCh y su eficacia catalítica es mayor que la presente en músculo por ese mismo sustrato, como indican sus constantes de Michaelis-Menten (K_m) y el cociente V_{max}/K_m . También se deduce que la afinidad de la colinesterasa presente en músculo para ASCh es menor que la medida para BSCh, por el contrario la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max}) de la ChE muscular sobre ASCh fue mayor.
5. La actividad colinesterasa presente en cerebro y músculo de la dorada disminuye con la edad y tamaño corporal. El análisis de correlación mostró una correlación negativa significativa entre la actividad ChE y el peso y entre la actividad ChE y la longitud, entre otras variables morfométricas. El mejor ajuste se obtuvo tomando una función de tipo potencial. Sin embargo, mientras que el valor de longitud y peso corporal explican la variabilidad de la AChE muscular en porcentajes que superan el 82%, para el caso de la actividad AChE cerebral y BChE muscular los porcentajes descienden hasta menos del 18%.
6. La inhibición de las enzimas colinesterasas presentes en cerebro y músculo de la dorada sigue una cinética de Michaelis-Menten de pseudo-primer orden. Según los valores de la constante k_i y de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) predicha a partir de aquélla, la tendencia en orden creciente de potencia inhibitoria de la AChE cerebral de la dorada es: ometoato < diclorvos < paraoxón < azinfosmetil-oxón. Esa misma tendencia es observada también para la inhibición de la AChE muscular.

7. Para tres de los cuatro compuestos organofosforados objeto del estudio (diclorvos, ometoato y paraoxón), la BChE muscular resultó ser de 2 a 4 veces más sensible que la AChE cerebral y muscular. En el caso del azinfosmetil-oxón, la BChE fue unas dos veces más sensible que la AChE cerebral.
8. Teniendo en cuenta las DE_{50} para la inhibición de la AChE cerebral tras administración de los distintos organofosforados por vía i.p., se deduce que el azinfosmetil es el inhibidor más potente seguido del paratión y del dimetoato. En el caso del diclorvos no fue posible calcular este índice de toxicidad. Esta tendencia está de acuerdo con la toxicidad aguda de estos compuestos para otras especies de peces, en base a su CL_{50} -24 h.
9. Individuos adultos de esta especie fueron capaces de sobrevivir con niveles de inhibición de la AChE cerebral superiores al 90%.
10. Los compuestos de tipo tiofosfato (azinfosmetil, dimetoato y paratión) produjeron una inhibición de la AChE cerebral que alcanzó valores máximos sobre las 24 h tras el tratamiento por vía i.p. y no se recuperaban los valores normales tras un período de 7 días; sin embargo, para el diclorvos, que a diferencia de los anteriores es de tipo fosfato, la inhibición máxima se obtuvo durante las primeras horas y al cabo de una semana se recuperaba totalmente la actividad enzimática.
11. La recuperación de la AChE muscular siguió un perfil similar a la AChE cerebral, mientras que la BChE muscular mostró una recuperación más lenta.
12. Finalmente, para un uso futuro de este biomarcador en la dorada debe tenerse en cuenta que el cerebro tiene la ventaja de que presenta una actividad enzimática mucho mayor que el músculo y solo está presente actividad AChE. Sin embargo, este último tejido es más fácil de recoger y más abundante que el anterior. Además, las características de la BChE muscular (mayor sensibilidad y recuperación de la actividad basal más lenta) apoyaría su utilidad como biomarcador de exposición a organofosforados en esta especie.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Arab AAK, Ayesh AM, Amra HA, Naguib K. Characteristic levels of some pesticides and heavy metals in imported fish. *Food Chem* 1996;57:487-92.
- Afifi NA, Ramadan A, El-Aziz MI, Saki EE. Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats. *DTW Deutsch Tierärztliche Wochenschrift* 1991;98:419-23.
- Agrahari S, Pandey KC, Gopal K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic Biochem Physiol* 2007;88:268-72.
- Ahmed GM, Davies DR. Chronic organophosphate exposure: towards the definition of a neuropsychiatric syndrome. *J Nutr Environ Med* 1997;7:169-76.
- Al Kuisi M. Adsorption of dimethoate and 2,4-D on Jordan Valley soils and their environmental impacts. *Environ Geol* 2002;42:666-71.
- Aldridge WN. Serum esterase: I. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 1953;53:110-17.
- Aldridge WN. Survey of major points of interest about reactions of cholinesterases. *Croat Chem Acta*: 1976;47:225-33.
- Allon N, Raveh L, Gilat E, Cohen E, Grunwald J, Ashani Y. Prophylaxis against soman inhibition toxicity in guinea pigs by pretreatment alone with human serum butyrylcholinesterase. *Toxicol Sci* 1998;43:121-28.
- Alpuche-Gual L, Gold-Bouchot G. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;71:787-97.
- Andersen RA, Aaraas I, Gaare G, Fonnum F. Inhibition of acetylcholinesterase from different species by organophosphorus compounds, carbamates and methylsulphonylfluoride. *Gen Pharmacol* 1977;8:331-34.
- Andreescu S, Marty JL. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol Eng* 2006;23:1-15.
- Arias A. Biología y cultivo experimental de la dorada, *Sparus aurata* L. y del róbalo, *Dicentrarchus labrax* L. de estero y estudio de las salinas de Cádiz en relación con su aprovechamiento en cultivos marinos [Tesis doctoral]. Puerto Real (Cádiz): Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMA); 1978.
- Arias AM. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del róbalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Inv Pesq* 1980;44:59-83.

- Arufe MI, Arellano JM, Albendín G, Sarasquete C. Toxicity of parathion on embryo and yolk-sac larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Effects on survival, cholinesterase and carboxylesterase activity [En prensa]. Environ Toxicol.
- Arufe MI, Arellano JM, García L, Albendín G, Sarasquete C. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: Characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. Aquat Toxicol 2007;84:328-36.
- Athanasopoulos PE, Kyriakidis NV, Stavropoulos P. A Study on the environmental degradation of pesticide azinphos methyl and parathion methyl. J Environ Sci Health 2004;39B:297-309.
- Atis S, Çömelekoglu U, Coskun B, Özge A, Rezos G, Talas D. Electrophysiological and histopathological evaluation of respiratory tract, diaphragm, and phrenic nerve after dichlorvos inhalation in rats. Inhal Toxicol 2002;14:199-215.
- Awasthi M, Shah P, Dubale MS, Gadhia P. Metabolic changes induced by organophosphates in the piscine organs. Environ Res 1984;35:320-25.
- Bad Perired C. El Mar Mediterráneo: Recursos vivos y explotación. España: Editorial Ariel; 2004.
- Baer KN, Olivier K, Pope CN. Influence of temperature and dissolved oxygen on the acute toxicology of profenofos to fathead minnows (*Pimephales promelas*). Drug Chem Toxicol 2002;25:231-45.
- Bagchi M, Zafra S, Bagchi D. DNA damage, gene expression and carcinogenesis by organophosphates and carbamates. En: Gupta R, editor. Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. New York: Academic Press; 2006. p. 533-48.
- Bai Y, Zhou L, Wang J. Organophosphorus pesticide residues in market foods in Shaanxi area, China. Food Chem 2006;98:240-42.
- Barnabé G. La cría de lubina y dorada. Vol. II. En: Barnabé G, editor. Acuicultura. Barcelona: Ediciones Omega; 1991. p. 573-612.
- Bauchot ML, Hureau JC. Sparidae. En: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nilsen J, Tortonese E eds. Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Unesco; 1986. p. 883-907.
- Beauvais SL, Cole KJ, Atchison GJ, Coffey M. Factors affecting cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). Water Air Soil Pollut 2002;135:249-64.

- Becker K, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Hoppe HW, Ball M, et al. GerES IV Pilot Study: Assessment of the exposure of german children to organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209:221-33.
- Benke GM, Cheever KL, Mirer FE, Murphy SD. Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974;28:97-109.
- Berenzen N, Lentzen-Godding A, Probst M, Schulz H, Schulz R, Liess M. A Comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* 2005;58:683-91.
- Bocquené G, Galgani F, Walker H. Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. En: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, editors. *Biomarqueurs en écotoxicologie-aspects fondamentaux*. Paris: Masson; 1997b. p. 209-40.
- Bocquené G, Roig A, Fournier D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). *FEBS Lett* 1997a;407:261-66.
- Bolton-Warberg M, Coen LD, Weinstein JE. Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: laboratory and field studies. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007;52:207-16.
- Bonacci S, Browne MA, Dissanayake A, Hagger JA, Corsi I, Focardi S, Galloway TS. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Mar Pollut Bull* 2004;49:445-55.
- Bonacci S, Corsi I, Focardi S. Cholinesterase activities in the adductor muscle of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Antarctic Sci* 2006;18:15-22.
- Bonacci S, Corsi I, Focardi S. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. *Sci Total Environ* 2008;392:99-109.
- Boone JS, Chambers JE. Biochemical factors contributing to toxicity differences among chlorpyrifos, parathion, and methyl parathion in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquat Toxicol* 1997;39:333-43.
- Boone JS, Chambers JE. Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities and non protein sulfhydryl levels following exposure to

- organophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). Fund Appl Toxicol 1996;29:202-7.
- Boros LG, Williams RD. Chronic isofenphos poisoning: case report of agnogenic myeloid metaplasia with a rapid progression into acute myeloid leukemia. Leuk Res 1998;22:849-51.
 - Botsoglou NA, Fletouris DJ. Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety and analysis. New York: Marcel Dekker, Inc; 2000.
 - Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72: 248-54
 - Brealey CJ, Walker CH, Baldwin BC. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphosmethyl to birds and mammals. Pestic Sci 1980;11:546-54.
 - Brimijoin S. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. Prog Neurobiol 1983;21:291-322.
 - Brunet R, Girard C, Cyr A. Comparative study of the signs of intoxication and changes in activity level of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) exposed to dimethoate. Agri Ecosyst Environ 1997;64:201-09.
 - Brunetto R, Burguera M, Burguera JL. Organophosphorus pesticide residues in some watercourses from Mérida, Venezuela. Sci Total Environ 1992;114:195-204.
 - Buchmann K, Bresciani J. Monogenea (*Phylum platyhelminthes*). En: Woo PTK, editor. Fish diseases and disorders. 2ª ed. Vol I. Protozoan and metazoan infections. Wallingford: Editorial CABI Publishing; 2006. p. 297-345.
 - BurrIDGE LE, Haya K, Waddy SL. Seasonal lethality of the organophosphate pesticide, azamethiphos to female american lobster (*Homarus americanus*). Ecotoxicol Environ Saf 2005;60:277-81.
 - Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Duran V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorus pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. Environ Health Perspect 2001;109:471-79.
 - Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci Total Environ 2000;247:295-311.

- Can A, Ulusoy H, Erciyes N. An Intermediate syndrome after parathion poisoning. *Intensive Care Med* 2001;27:333.
- Canty MN, Hagger JA, Moore RTB, Cooper L, Galloway TS. Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull* 2007;54:396-402.
- Carr RL, Chambers JE. Kinetic analysis of the in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;139:365-73.
- Carr RL, Chambers JE. Toxic Responses of the nervous system. En: Schlenk D, Benson WH, editors. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts system*. Vol II. London: CRC Press LLC; 2001. p. 27-74.
- Carr RL, Ho LL, Chambers JE. Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: biochemical mechanisms. *Environ Toxicol Chem* 1997;16:2369-74.
- Carr RL, Straus DL, Chambers JE. Inhibition and aging of channel catfish brain acetylcholinesterase following exposure to two phosphorothionate insecticides and their active metabolites. *J Toxicol Environ Health* 1995;45:325-36
- Castelló-Orvay F, Calderer A. Growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) under different culture conditions. En: Barnabé G, Kestemont P editors. *Ghent: EAS Special publication*; 1993. pp. 227-33.
- Chambers JE, Boone JS, Carr RL, Chambers HW, Straus DL. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum Ecol Risk Assess* 2002;8:165-76.
- Chambers JE, Carr RL. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 1995;105:291-304
- Chambers JE, Ma T, Boone JS. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sci* 1994;54:1357-64
- Chandrasekara LWHU, Pathiratne A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007;67:109-19.
- Charpentier A, Menozzi P, Marcel V, Villate F, Fourier D. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Anal Biochem* 2000;285:76-81.
- Chattipakorn S, Pongpanparadorn A, Pratchayasakul W, Pongchaidacha A, Ingkaninan K, Chattipakorn N. *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits

- neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *J Ethnopharmacol* 2007;110:61-8.
- Chen Z, Juneau P, Qiu B. Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (*Nostoc*). *Aquat Toxicol* 2007;81:256-65.
 - Chernyshevskaya IA. Histochemistry of cholinesterases in brain cortex (In Russian). Nauka Moscow. 1983.
 - Chiu YC, Main AR, Dauterman WC. Affinity and Phosphorylation constants of a series of o-odalkyl-malaoxons and paraoxons with acetylcholinesterase. *Biochem Pharmacol* 1969;18:2171-77.
 - Chuiko GM, Podgornaya VA, Zhelnin YY. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comp Biochem Physiol* 2003;135B:55-61.
 - Chuiko GM. Comparative Study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comp Biochem Physiol* 2000;127C:233-42.
 - Coeurdassier M, Gomot de Vauflery A, Saint-Denis M, Ribera D, Narbonne JF, Badot PM. Effects of Dimethoate on snail B-esterase and growth as function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassays. *Biomarkers* 2002;7:138-50.
 - Coll Morales J. Acuicultura marina animal. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1991.
 - Cope WG, Leidy RB, Hodgson E. Classes of toxicants: Use classes. En: Hodgson E. New Jersey: John Wiley&Sons, Inc.; 2004. p. 49-74.
 - Coppage DL. Organophosphate pesticides: Specific level of brain AChE inhibition related to death in sheepshead minnows. *Trans Am Fish Soc* 1972;101:534-6.
 - Coppage DL, Braidech TE. River pollution by anticholinesterase agents. *Water Res* 1976;10:19-24.
 - Coppage DL, Matthews E. Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterase of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull Environ Contam Toxicol* 1974;11:483-8.
 - Corsi I, Bonacci S, Santolito G, Chiantorec MC, Castagnoloa L, Focardia S. Preliminary investigation on cholinesterases activity in *Adamussium colbecki*

- from Terra Nova Bay: Field and laboratory study. *Chem Ecol* 2004;20 Suppl 1:79-87.
- Corsi I, Pastore AM, Lodde A, Palmerini E, Castagnolo L, Focardi S. Potencial role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anadonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp. *Comp Biochem Physiol* 2007;145C:413-9.
 - Costa JRMA, Mela M, Da Silva de Assis HC, Pelletier E, Ferreira MA, De Oliveira CA. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007;67:82-8.
 - Costa LG. Basic toxicology of pesticides. *Occup Med State Art Rev* 1997;12:251-67.
 - Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 2006;366:1-13.
 - Cunha I, Mangas-Ramirez E, Guilhermino L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and Glutathione S-transferase activities of two marine gasteropods (*Monodonta lineate* and *Nucella lapillus*). *Comp Biochem Physiol* 2007;145C:648-57.
 - Dabrowski JM, Bennett ER, Bollen A, Schulz R. Mitigation of azinphos-methyl in a vegetated stream: comparison of runoff- and spray-drift. *Chemosphere* 2006;62:204-12.
 - Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou R, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. Evaluation of neutral red retention assay, Micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar Environ Res* 2003;56:443-70.
 - Das PC, Ayyappan S, Das BK, Jena JK. Nitrite toxicity in Indian Major Carps: sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. *Comp Biochem Physiol* 2004;138C:3-10.
 - Dasgupta S, Meisner C, Wheeler D, Xuyen K, Lam NT. Pesticide poisoning of farm workers-implications of blood test results from Vietnam. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:121-32.
 - De Bleecker JL. Intermediate syndrome in organophosphate poisoning. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 371-80.

- De Castro VL, Chiorato SH, Pinto NF. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. *Toxicol Lett* 2000;118:93-102.
- De Conto Cinier C, Petit-Ramel M, Bortolato M. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull Environ Contam Toxicol* 1998;61:793-9.
- De la Torre FR, Ferrari L, Salibián A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp Biochem Physiol* 2002; 131C:271-80.
- De la Vega MY, Martínez L, Macías C. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997;38:53-62.
- De Silva HJ, Samarawickrema LA, Wickremasinghe AR. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure? *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2006;100:803-6.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C. Ghrelin Degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004;145:4997-5005.
- Dési I, Nagymajtényi L. Electrophysiological biomarkers of an organophosphorous pesticide, dichlorvos. *Toxicol Lett* 1999;107:55-64.
- Devillers J. Acute toxicity of pesticides to bees. En: Devillers J, Minh-Hà, Pham-Delègue, editors. *Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals*. Florence: Taylor&Francis, Inc.; 2002. p. 56-66.
- Dizer H, Fischer B, Harabawy ASA, Hennion MC, Hansen PD. Toxicity of domoic acid in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 2001;55:149-56.
- Dobson DP, Tack TJ. Evaluation of the dispersion of treatment solutions of dichlorvos from marine salmon pens. *Aquaculture* 1991;95:15-32.
- Dugo G, Di Bella G, La Torre L, Saitta M. Rapid GC-FPD Determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil. *Food Control* 2005;16:435-38.
- Duquesne S. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: implications for population dynamics. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;65:145-50.
- Ecobichon DJ. Efectos tóxicos de los pesticidas. En: Klaassen CD, Watkins JB, editors. *Madrid: McGraw-Hill*: 2005. p. 339-53.

- El-Kabbany S, Rashed MM, Zayed MA. Monitoring of the pesticide levels in some water supplies and agricultural land, in El-Haram, Giza (A. R. E.). J Hazard Mater 2000;72A:11-21.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone I, Featherstone RM. A new and rapid colometric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961;7:88-95.
- Elumalai M, Antunes C, Guilhermino L. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. Water Air Soil Poll 2002;141: 273-80.
- Endlweber K, Schädler M, Scheu S. Effects of foliar and soil insecticide applications on the collembolan community of an early set-aside arable field. Appl Soil Ecol 2006;31:136-46.
- Escartín E, Porte C. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. Environ Toxicol Chem 1997;16:2090-5.
- Eto M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. Ohio: CRC Press, Inc; 1974.
- EXTTOXNET. Pesticide information profiles. 1993. [En línea] 1993. [Consultada 9 abril 2009]. Disponible en: <http://exttoxnet.orst.edu/ghindex.html>
- FAO. Codex Alimentarius Commission, Codex alimentarius pesticide residues in food maximum residues limits. 2nd ed. Roma: Publishing management services of United Nations; 1996.
- FAO. Programa de información de especies acuáticas. Colloca F, Cerasi S. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department. [En línea]. 2007. [Consultada 9 abril 2009]. Disponible en :
URL:http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es
- Farag AT, Abdel-Zaher T, El Okazy A. Developmental toxicity of orally administered technical dimethoate in rats. Birth Defects Res 2006;77B:40-6.
- Farag AT, El-Aswad AF, Shaaba NA. Assesment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. Reprod Toxicol 2007;23:232-38.
- Farag AT, Eweidah MH, El-Okazy AM. Reproductive toxicology of acephate in male mice. Reprod Toxicol 2000;14:457-62.
- Fenske RA, Curl CL, Kissel JC. The effect of the 14-day agricultural restricted entry interval on azinphosmethyl exposures in a group of apple thinners in Washington State. Regul Toxicol Pharmacol 2003;38:91-7.

- Ferrari A, Anguiano OI, Soleño J, Venturino A, Pechén de D'Angelo AM. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. Comp Biochem Physiol 2004b;139C:239-43.
- Ferrari A, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol Environ Saf 2004a;57:420-5.
- Ferrari A, Venturino A, Pechén de D'Angelo AM. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comp Biochem Physiol 2007;146C:308-13.
- Ferrari I, Chierigato AR. Feeding habits of juvenile stages of *Sparus aurata* L., *Dicentrarchus labrax* L. and mugilidae in a brackish embayment of the Po River Delta. Aquaculture 1981;25:243-57.
- Ferrer A. Intoxicación por plaguicidas. Anales Sis San Navarra 2003;26 Suppl1:155-71.
- Filho MVS, Oliveira MM, Salles JB, Cunha Bastos VLF, Cassano VPF, Cunha Bastos J. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylthiocholinesterases from brain of neotropical fishes. Toxicol Lett 2004;153: 247-54.
- Fishwick SK, Shore RF, Turk A, Sparks TH. Variation of brain and serum cholinesterase activity with age in wild small mammals. Bull Environ Contam Toxicol 1996;56:604-11.
- Flammarion P, Noury P, Garric J. The Measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. Environ Pollut 2002;120:325-30.
- Forgash A, History, evolution, and consequences of insecticide resistance, Pestic Biochem Physiol 1984;22:178–86.
- Forget J, Beliaeff B, Bocquené G. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine river estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. Aquat Toxicol 2003;62:195-204.
- Forsberg A, Puu G. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organophosphates and carbamates. Eur J Biochem 1984;140 (1):153-6.

- Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L. Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquat Toxicol* 2006;77:412-21.
- Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 1990;87:245-54.
- Fulton M, Key P, Andrews M. The *in vitro* effects of paraoxon exposure on brain and muscle acetylcholinesterase activity in two estuarine fish species. En: *Proceedings of the 19th Annual Meeting*. Charlotte (USA): Society of Environmental Toxicology and Chemistry; 1998. p. 54.
- Fulton MH, Key PB. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:37-45.
- Gagnaire B, Geffard O, Xuereb B, Margoum C, Garric J. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere* 2008;71:553-60.
- Galgani F, Bocquene G. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990;45:243-9.
- Gallo MA, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. En: Hayes WJ, Laws ER, editors. *Handbook of pesticide toxicology*. New York: Academic Press; 1991. p. 917–1123.
- Garcia LM, Castro B, Ribeiro R, Guilhermino L. Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its *in vitro* inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers* 2000; 5(4): 274-84.
- García-Repetto R, Martínez D, Repetto M. The influence of pH on the degradation kinetics of some organophosphorus pesticides in aqueous solutions. *Vet Hum Toxicol* 1994;36(3):202-4.
- García-Repetto R, Repetto M. *Toxicología de los plaguicidas*. Ed: Area de Toxicología Univ. De Sevilla, 2003; *Toxicología de Postgrado*. Repetto M.
- Gard NW, Hooper MJ. Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterases activities of eastern bluebirds and european starlings. *J Wildl Dis* 1993;29:1-7.
- Garg UK, Pal AK, Jha GJ, Jadhao SB. Haemato-biochemical and immunopathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid,

- organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. *Int Immunopharmacol* 2004;4:1709-22.
- Geng BR, Yao D, Xue QQ. Acute toxicity of the pesticide dichlorvos and the herbicide butachlor to tadpoles of four anuran species. *Bull Environ Contam Toxicol* 2005;75:343-9.
 - Gill TS, Tewari H, Pande J. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchonus* Ham. (rosy barb). *Comp Biochem Physiol* 1991;100C:501-5.
 - Gisbert JA, Villanueva E. Intoxicaciones por plaguicidas. En: Gisbert JA. *Medicina legal y toxicología*. Barcelona: Mason, SA; 1998. p. 806-16.
 - Gómez-Arroyo S, Cortés-Eslava J, Villalobos-Pietrini R, Calderón-Segura ME, Lores-Márquez AR, Espinosa-Aguirre JJ. Differential mutagenic response of *Salmonella typhimurium* to the plant-metabolized organophosphorus insecticides, phoxim and azinphos methyl. *Toxicol In Vitro* 2007;21(5):950-5.
 - Goodall R. Cholinesterase pharmacogenetics. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 187-198.
 - Goodwin S, Ahmad N. relationship between azinphos-methyl usage and residues on grapes and in wine in Australia. *Pestic Sci* 1998;53:96-100.
 - Gormley KL, Teather KL, Guignon DL. Changes in salmonid communities associated with pesticide runoff events. *Ecotoxicology* 2005;14:671-8.
 - Gosselin NH, Bouchard M, Brunet RC, Dumoulin MJ, Carrier G. Toxicokinetic modelling of parathion and its metabolites in humans for the determination of biological reference values. *Toxicol Mech Methods* 2005;15:33-52.
 - Götz R, Bauwr OH, Friesel P, Roch K. Organic trace compounds in the water of the river Elbe near Hamburg (Part II). *Chemosphere* 1998;36(9):2103-18.
 - Graham DJ, DesGranges JL. Effects of the organophosphate azinphos-methyl on birds of potato fields and apple orchards in Quebec, Canada. *Agri Ecosyst Environ* 1993;43:183-99.
 - Gray PI, Dawson RM. Kinetic constants for the inhibition of eel and rabbit brain acetylcholinesterase by some organophosphates and carbamates of military significance. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;91:140-4.
 - Grippo MA, Heath AG. The Effect of mercury on the feeding behaviour of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;55:187-98.

- Gronseth GS. Gulf war syndrome: a toxic exposure? A systematic review. *Neurol Clin* 2005;23:523-40.
- Gruber SJ, Munn MD. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*). *Arch Environ Contam Toxicol* 1998;35:391-6.
- Guilhermino L, Barros P, Silva MC, Soares AMVM. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?. *Biomarkers* 1998;3:157-63.
- Guilhermino I, Lopes MC, Carvalho AP, Soares AMVM. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 1996;32:727-38.
- Gupta RC. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanism of organophosphates and carbamates. *Toxicol Mech Methods* 2004;14:103-43.
- Gupta RC. Organophosphates and carbamates. En: Gupta RC, editor. *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles*. New York: Academic Press; 2007. p. 477-88.
- Gupta SC, Siddique HR, Mathur N, Mishra RK, Saxena DK, Chowdhuri DK. Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: 70 kDa heat shock protein as a marker of cellular damage. *Toxicology* 2007;238(1):1-14.
- Gwinner E. Circannual rhythms in birds. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13:770-8.
- Hagar HH, Fahmy AH. A biochemical, histochemical and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. *Toxicol Lett* 2002;133:161-70.
- Hall LW, Killen WD. Temporal and spatial assessment of water quality, physical habitat, and benthic communities in an impaired agricultural stream in California's San Joaquin valley. *J Environ Sci Health* 2005;40A:959-89.
- Hamers T, Krogh PH. Predator-prey relationships in a two-species toxicity test system. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997;37:203-12.
- Hanley ME, Whiting MD. Insecticides and arable weeds: effects on germination and seedling growth. *Ecotoxicology* 2005;14:483-90.
- Hazel J. The effect of thermal acclimation upon brain cholinesterase activity of *Carassius auratus* and *Fundulus heteroclitus*. *Life Sci* 1969;8(2):775-84.
- Herzsprung P, Weil L, Niessner R. Measurement of bimolecular rate constants k_i of the cholinesterase inactivation reaction by 55 insecticides and of the

- influence of various pyridiniumoximes on k_i . *Int J Environ Anal Chem* 1992;47:181-200.
- Hill EF. Wildlife toxicology of organophosphorus and carbamate pesticides. En: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J, editors. *Handbook of ecotoxicology*. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press LLC; 2003. p. 282-312.
 - Hochachka PW, Somero GM. *Biochemical adaptation*. New York: Princeton University Press; 1984.
 - Hoffman RS, Morasco R, Goldfrank LR. Administration of purified human plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996;34(3):259-66.
 - Hoffmann U, Papendorf T. Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Med* 2006;32:464-8.
 - Huang TL, Obih PO, Jaiswal R, Hatley WR, Thiyagarajah A. Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi river basin. *Bull Environ Contam Toxicol* 1997;58:688-95.
 - IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC press; 1983. (Monographs; vol 30).
 - IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: occupational exposures in insecticide application and some pesticides. Lyon: IARC press; 1991. (Monographs; vol 53).
 - Ishmael J, MacGregor JA, Manley A. Diclorvos-A comprehensive review of 11 rodent carcinogenicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006;44:238-48.
 - Jaffrezic-Renault N. New Trends in biosensors for organophosphorus pesticides. *Sensors* 2001;1:60-74.
 - Jamal GA, Hansen S, Julu P. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology* 2002;181:23-33.
 - Jett DA, Lein PJ. Noncholinesterase mechanisms of central and peripheral neurotoxicity: muscarinic receptors and other targets. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 233-45.
 - Johnson JA, Wallace KB. Species-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase by paraoxon and malaoxon. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;88:234-41.
 - Jokanovic M, Stukalov PV, Kosanovic M. Organophosphate induced delayed polyneuropathy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2002;1:593-602.

- Jokanovic M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 2001;166:139-60.
- Joshi SC, Marthur R, Gajraj A, Sharma T. Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;14:91-8.
- Jung JH, Addison RF, Shim WJ. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition *in vitro* by the fungicide iprobenfos. *Mar Environ Res* 2007;63:471-8.
- Kamath V, Rajini PS. Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology* 2007;231:137-46.
- Kamrin MA. Pesticides profiles. Toxicology, environmental impact, and fate. New York: CRC Press LLC; 2000.
- Kapin MA, Ahmed S. Esterases in larval tissues of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L): optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem* 1980;10:331-7.
- Karanth S, Liu J, Ray A, Pope C. Comparative *in vivo* effects of parathion on striatal acetylcholine accumulation in adult and aged rats. *Toxicology* 2007;239:167-79.
- Kardos SA, Sultatos LG. Interactions of the organophosphates paraoxon and methyl paraoxon with mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicol Sci* 2000;58:118-26.
- Karger B, Lorin de la Grandmaison G, Bajanowski T, Brinkmann B. Analysis of 155 consecutive forensic exhumations with emphasis on undetected homicides. *Int J Legal Med* 2004;118:90-4.
- Karunaratne SHPP, Damayanthi BT, Fareena MHJ, Imbuldeniya V, Hemingway J. Insecticide resistance in the tropical bedbug *Cimex hemipterus*. *Pestic Biochem Physiol* 2007;88:102-7.
- Kavitha P, Rao JV. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic Biochem Physiol* 2007;87:182-8.
- Kemp RJ, Wallace KB. Molecular determinants of species-selective inhibition of brain acetylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;104:246-58.
- Kevan PG. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agri Ecosyst Environ* 1999;74:373-93.

- Kirby MF, Morris S, Hurst M, Kirby SJ, Neall P, Tylor T, Fagg A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar Pollut Bull* 2000;40:780-91.
- Kitz R, Wilson IB. Ester of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1962;237:3245-9.
- Klöppel H, Kördel. Pesticide volatilization and exposure of terrestrial ecosystems. *Chemosphere* 1997;35(6):1271-89.
- Koven W. Gilt-head sea bream, *Sparus aurata*. En: Webster CD, Lim C, editors. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Cambridge: CABI Publishing; 2002. p. 64-78.
- Kozlovskaya VI, Mayer FL, Menzikova OV, Chuiko GM. Cholinesterase of aquatic animals. *Rev Environ Contam Toxicol* 1993;132:117-42.
- Kristoff G, Verrengia N, Pechén de D'Angelo AM, Cochón AC. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology* 2006;222:185-94.
- Kula H, Larink O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biol Biochem* 1997; 29:635-9.
- Labrot F, Ribera D, Saint Denis M, Narbonne JF. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathion peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1996;1:21-8.
- Lacassie E, Marquet P, Gaulier JM, Dreyfuss MF, Lachâtre. Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. *Forensic Sci Int* 2001;121:116-25.
- Lambropoulou DA, Sakkas VA, Hela DG, Albanis TA. Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas river (NW Greece). *J Chromatogr* 2002;963A:107-16.
- Lau PS, Wong HL, Garrigues P. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in Eastern oceanic and Western estuarine waters of Hong Kong. *Cont Shelf Res* 2004;24:1969-87.
- Lazarini CA, Lima RY, Guedes AP, Bernardi MM. Prenatal Exposure to diclorvos: physical and behavioral effects on rat offspring. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:607-14.

- Lee EY, Gil HW, Jung DS. A case of horner's syndrome and delayed polyneuropathy due to dichlorvos intoxication. Clin Toxicol 2006;44:197-9.
- Leibel WS. An analysis of esterase activities from surgeonfish tissues yields evidence of an atypical pseudocholinesterase. Comp Biochem Physiol 1988;91B:437-47.
- Levario-Carrillo M, Olave ME, Chávez D, Gutiérrez J, Gaglioti SM, Bevilacqua E. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. Exp Toxic Pathol 2004;55:489-96.
- Li D, Dong M, Shim WJ, Hong SH, Oh J-R, Yim UH, et al. Seasonal and spatial distribution of nonyphenol and IBP in Saemangeum bay, Korea. Mar Pollut Res 2005;51:966-74.
- Linderman VF. A comparative study of the cholinesterase activity of the vertebrate nervous system, with especial reference to its relationship to motor ability. Am J Physiol 1945;143:687-95.
- Liu J, Pope CN. Comparative presynaptic neurochemical changes in rat striatum following exposure to chlorpyrifos or parathion. J Toxicol Environ Health 1998;53A:531-44.
- Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. J Biol Chem 1987;262:549-57.
- Lockridge O, Duysen EG, Voelker T, Thompson CM, Schopfer LM. Life without acetylcholinesterase: the implications of cholinesterase inhibitor toxicity in AChE-knockout mice. Environ Toxicol Pharmacol 2005;19:463-9.
- Loewy M. Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Neuquen [tesis de maestria]. Buenos Aires: Universidad Nacional de Comahue; 2000.
- Loewy RM, Carvajal LG, Novelli M, Pechen de D'Angelo AM. Azinphos methyl residues in shallow groundwater from the fruit production Region of Northern Patagonia, Argentina. J Environ Sci Health 2006;41B:869-81.
- Loewy RM, Carvajal LG, Novelli M, Pechen de D'Angelo AM. Effect of pesticide use in fruit production orchards on shallow ground water. J Environ Sci Health 2003; 38B(3):317-25.
- Logaswamy S, Radha G, Subhashini S, Logankumar K. Alterations in the levels of ions in blood and liver of freshwater fish, *Cyprinus carpio* var. *communis* exposed of dimethoate. Environ Monit Assess 2007;131:439-44.

- Lotti M, Moretto A. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Rev* 2005;24:37-49.
- Lotti, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger RI, editor. *Handbook of pesticide toxicology*. 2ª ed. San Diego: Academic Press; 2001. p.1043-85.
- Lu C, Kedan G, Fisker-Andersen J, Kissel JC, Fenske RA. Multipathway organophosphorus pesticide exposures of preschool children living in agricultural and nonagricultural communities. *Environ Res* 2004;96:283-9.
- Lundebye AK, Curtis TM, Braven J, Depledge MH. Effects of organophosphorus pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquat Toxicol* 1997;37:183-200.
- Lundin SJ. Comparative studies of cholinesterases in body muscles fish. *J Cell Comp Physiol* 1962;59:93-105.
- Lundin SJ. Properties of a cholinesterase from body muscle of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Acta Chem Scand* 1968;22:2183-90.
- Ma T, Chambers JE. A kinetic analysis of hepatic microsomal activation of parathion and chlorpyrifos in control and phenobarbital-treated rats. *J Biochem Toxicol* 1995;10:63-8.
- MacGregor JA, Plunkett LM, Hunter S, Manley A, Plunkett JB, Starr TB. Humans appear no more sensitive than laboratory animals to the inhibition of red blood cell cholinesterase by dichlorvos. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005;43:150-67.
- Magnotti RA, Zaino JP, McConnell RS. Pesticide-sensitive fish muscle cholinesterases. *Comp Biochem Physiol* 1994;108C:187-94.
- Mahjoubi-Samet A, Fetoui H, Boujelben G, Jamoussi K, Ammar E, Ellouze F, et al. Effects of dimethoate on bone maturation of young rats during the suckling period. *Pestic Biochem Physiol* 2005;83:132-9.
- Main A. Affinity and phosphorylation constant for the inhibition of esterases by organophosphates. *Science* 1964;144:992-3.
- Main AR, Iverson F. Measurement of the affinity and phosphorylation constants governing irreversible inhibition of cholinesterases by di-isopropyl phosphofluoridate. *Biochem J* 1966;100:525-31.
- Margalef R. *Ecología*. Barcelona: Ediciones Omega SA; 1991.
- Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. Organophosphorous pesticides. *Toxicology* 2000;143:9-37.

- Marrs TC, Vale JA. Management of organophosphorus pesticides poisoning. En: Gupta R, editor. Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. New York: Academic Press; 2006. p. 715-33.
- Martikainen E, Haimi J, Ahtiainen J. Effects of dimethoate and benomyl on soil organisms and soil processes - a microcosm study. Appl Soil Ecol 1998;9:381-7.
- Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallentte FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog Neurobiol 1993;41:31-91.
- Massoulié J. Molecular forms and anchoring of acetylcholinesterase. En: Giacobini E, editor. Cholinesterases and cholinesterases inhibitors. London: Martin Dunitz Ltd; 2000. p. 81-101.
- Matozzo V, Tomei A, Marin MG. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. Mar Pollut Bull 2005;50:1686-93.
- Mattingly JE, Sullivan JE, Spiller HA, Bosse GM. Intermediate syndrome after exposure to chlorpyrifos in a 16-month-old girl. J Emerg Med 2003;25:379-81.
- Maxwell DM, Castro CA, De la Hoz DM, Gentry MK, Gold MB, Solana RP, et al. Protection of rhesus monkeys against soman and prevention of performance decrement by pretreatment with acetylcholinesterase. Toxicol Appl Pharmacol 1992;115:44-9.
- Maxwell DM. The specificity of carboxylesterases protection against the toxicity of organophosphorus compounds. Toxicol Appl Pharmacol 1992;114:306-12.
- McHenery JG, Linley-Adams GE, Moore DC, Rodger GK, Davies IM. Experimental and field studies of effects of dichlorvos exposure on acetylcholinesterase activity in the gills of the mussel, *Mytilus edulis* L. Aquat Toxicol 1997;38:125-43.
- Mehrani H. Protective effect of polyurethane immobilized human butyrylcholinesterase against parathion inhalation in rat. Environ Toxicol Pharmacol 2004;16:179-85.
- Mojetta A, Ghisotti A. Flora e fauna del Mediterraneo. Milán: Mondadorio Editore S. p. a.; 1994.
- Monserrat JM, Bianchini A, Bainy ACD. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. Mar Environ Res 2002;54:781-5.

- Monserrat JM, Bianchini A. Methodological and biological aspects to be considered in acetylcholinesterase reactivation assays using 2-PAM. *Environ Toxicol Pharmacol* 2000;9:39-47.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG, Pinho GLL, et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol* 2007;146C:221-34.
- Monserrat JM, Yunes JS, Bianchini A. Effects of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:1228-35.
- Monteiro M, Quintaneiro C, Morgado F, Soares AMVM, Guilhermino L. Characterization of the cholinesterase present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;62:341-7.
- Monteiro M, Quintaneiro C, Nogueira AJA, Morgado F, Soares AMVM, Guilhermino L. Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Kroyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest Coast. *Chemosphere* 2007;66:514-22.
- Moore MT, Lizotte RE, Knight SS, Smith S, Cooper CM. Assessment of pesticide contamination in three Mississippi Delta Oxbow Lakes using *Hyalella azteca*. *Chemosphere* 2007;67:2184-91.
- Mora P, Fournier D, Narbonne JF. Cholinesterase from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Müller. *Comp Biochem Physiol* 1999;122C:353-61.
- Moretti A, Pedini Fernandez-Criado M, Cittolin G, Guidastri R. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Vol I. Rome: Publishing management services of United Nations; 1999.
- Moretto A, Lotti M. Peripheral nervous system effects and delayed neuropathy. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 361-70.
- Morgan MJ, Fancey LL, Kiceniuk JW. Response and recovery of brain AChE activity in Atlantic salmon exposed to fenitrothion. *Can J Fish Aquat Sci* 1990;47:1652-4.
- Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007;14:289-300.

- Murphy LA, Lewbart GA, Meerdink GL, Bargren GL. Whole-blood and plasma cholinesterase levels in normal Koi (*Cyprinus carpio*). J Vet Diagn Invest 2005;17:74-5.
- Murphy SD, Lauwerys RR, Cheever KL. Comparative anticholinesterase action of organophosphorus insecticides in vertebrates. Toxicol Appl Pharmacol 1968;12:22-35.
- Mutch E, Daly AK. Do Multiple Cytochrome P450 Isoforms contribute to parathion metabolism in man? Arch Toxicol 2003;77:313-20.
- Napierska D, Podolska M. Preliminary results of AChE and GST measurements in flounder *Platichthys flesus* from the southern Baltic Sea. Bull Sea Fish Inst 2003;2:51-66.
- Narayana k, Prashanthi N, Nayranatara A, Kumar SG, Kumar HHC, Bairy KL, D'Souza UJA. A broad-spectrum organophosphate pesticide O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate (Methyl parathion) adversely affects the structure and function of male accesory reproductive organs in the rat. Environ Toxicol Pharmacol 2006;22:315-24.
- Nardi F, Carapelli A, Vontas JG, Dallai R, Roderick GK, Frati F. Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (*Bactrocera oleae*). Insect Biochem Mol Biol 2006;36:593-602.
- Norberg-King TJ. A linear interpolation method for sub-lethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. US Environmental Protection Agency, Environ Res Lab-Duluth (MN). NETAC technical report 03-93 of National Effluent Toxicity Assessment Center; 1993.
- Nowakowska M, Sterzel M, Zapotoczny S, Kot E. Photosensitized degradation of ethyl parathion pesticide in aqueous solution of anthracene modified photoactive dextran. Appl Catal B 2005;57:1-8.
- Nunes B, Carvalho F, Guilhermino L. Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. J Enzyme Inhib Med Chem 2005;20:369-76.
- Okamura A, Kamijima M, Shibata E, Ohtani K, Takagi K, Ueyama J, et al. A comprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorvos in wistar rats. Toxicology 2005;213:129-37.
- Oliveira MM, Filho MVS, Bastos VLF, Fernandes FC, Bastos JC. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using brazilian fishes. Mar Environ Res 2007;63:303-12.

- OMS Environmental Health Criteria 90, Dimethoate. Ginebra: WHO press; 1989. [En línea]. 1989. [Consultada 8 abril 2009]; Disponible en: [URL:http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc90.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc90.htm)
- OMS Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-2002. Ginebra: WHO press; 2002.
- OMS. Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública [En línea] 2003. [Consultada 11 abril 2009]. [URL:http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_WHOPES_2003.7_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_WHOPES_2003.7_spa.pdf)
- Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Gülsen S, Take G, et al. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. *Reprod Toxicol* 2006;22:783-90.
- Oruç EÖ, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:48-55.
- Owen R, Buxton L, Sarkis S, Toasperm M, Knap A, Depledge M. An Evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) zinzac*, for the rapid assessment of pesticide exposure. *Mar Pollut Bull* 2002;44:1010-17.
- Padungtod C, Savitz DA, Overstreet JW, Christiani DC, Louise MR, Xiping X. Occupational pesticide exposure and semen quality among chinese workers. *J Occup Environ Med* 2000;42:982-92.
- PAN (Pesticide Action Network) Pesticides Database [En línea] 2008. [Consultada 11 abril 2009]. Disponible en: <http://www.pesticideinfo.org/>
- Pant JC, Singh T. Inducement of metabolic dysfunction by carbamate and organophosphorus compounds in a fish, *Puntius Conchoniis*. *Pestic Biochem Physiol* 1983;20:294-8.
- Patel S, Bajpayee M, Pandey A, Parmar D, Dhawan A. *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol In Vitro* 2007;21:1409-18.
- Pathiratne A, Chandrasekera LW, De Seram PK. Effects of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. *Arch Environ Contam Toxicol* 2008;54:309-17.
- Pavan KI, Rajarami RG, Vilayakshmi S, Sasora BK. Cyclical acetylcholinesterase activity in diurnal *Calotes memoricola* and nocturnal *Mus booduga*. *J Interdiscipl Cycle Res* 1979;10:139-44.

- Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* 1996;32:225-31.
- Pedersen LF, Dall LG, Sorensen BC, Mayntz D, Toft S. Effects of hunger level and nutrient balance on survival and acetylcholinesterase activity of dimethoate exposed wolf spiders. *Entomol Exp Appl* 2002;103:197-204.
- Pelkonen O, Vahakangas K, Gupta RC. Placental toxicity of organophosphate and carbamate pesticides. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 463-79.
- Pfeifer S, Schiedek D, Dippner JW. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp.* from the south-western Baltic Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 2005;320:93-103.
- Phillips TA, Summerfelt C, Atchison GJ. Environmental, biological, and methodological factors cholinesterase activity in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Arch Environ Contam Toxicol* 2002;43:75-80.
- Piña-Gúzman B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta M, Quintanilla-Vega B. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;216:216-24.
- Pita C, Gamito S, Erzini K. Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). *J Appl Ichthyol* 2002;18:81-6.
- Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Filho DW, Dal-Pizzol F. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007;23:198-204.
- Prabhakaran SK, Kamble ST. Biochemical characterization and purification of esterase from three strains of german cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 1996;31:73-86.
- Quaghebeur D, De Smet B, De Wulf E, Steurbaut W. Pesticides in rainwater in Flandes, Belgium: results from the monitoring program 1997-2001. *J Environ Monit* 2004;6:182-90.
- Quintaneiro C, Monteiro M, Pastorinho R, Soares AMVM, Noqueira AJA, Morgado F, Guilhermino L. Environmental pollution and natural populations: A

- biomarkers case study from the Iberian Atlantic Coast. *Mar Pollut Bull* 2006;52:1406-13.
- Rabitto IS, Costa JRMA, Silva de Assis HC, Pelletier E, Akaishi FM, Anjos A, Randi MAF, Ribeiro CAO. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol Environ Saf* 2005;60:147-56.
 - Racke KD. Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. En: Chambers JE, Levi PE, editors. San Diego: Academic Press; 1992. p. 47-78.
 - Radenac G, Bocquené G, Fichet D, Miramand P. Contamination of a dredged-material disposal site (La Rochelle bay, France). The use of the acetylcholinesterase activity of *Mytilus edulis* (L.) as a biomarker of pesticides: the need for a critical approach. *Biomarkers* 1998;3:305-15.
 - Raheja G, Gill KD. Calcium homeostasis and dichlorvos induced neurotoxicity in rat brain. *Mol Cell Biochem* 2002;232:13-8.
 - Rastrelli L, Totaro K, De Simona F. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chem* 2002;79:303-5.
 - Ratageri RH, Taranath TC, Lakshman HC. Toxicity of dimethoate on primary productivity of a lentic aquatic ecosystem: a microcosm approach. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006;76:373-80.
 - Rath S, Misra BN. Toxicological effects of dichlorvos (DDVP) on brain and liver acetylcholinesterase (AChE) activity of *Tilapia mossambica* peters. *Toxicology* 1981;19:239-45.
 - Rattner BA, Fairbrother A. Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity. En: Mineau, P, editor. Cholinesterase inhibiting insecticides; their impact on wildlife and environment. New York: Elsevier Science; 1991. p. 19-33.
 - Raveh L, Grauer E, Grunwald J, Cohen E, Ashani Y. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;145:45-53.
 - Ray AK, Ghosh MC. Aquatic toxicity of carbamates and organophosphates. En: Gupta R, editor. Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. New York: Academic Press; 2006. p. 657-72.
 - Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol Lett* 2001;120:343-51.

- Reddy GR, Bhuvaneswari CD, Chetty CS. Developmental lead neurotoxicity: alterations in brain cholinergic system. *Neurotoxicology* 2007;28(2):402-7.
- Reinecke SA, Reinecke AJ. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007;66:244-51.
- Reiner E. Organophosphorus compounds and esterases: current research topics concerning toxicity of, and protection against organophosphates. Conference proceedings of chemical and biological medical treatment symposium (CBMTS) III; [En línea] 2000. Disponible en: URL:<http://www.jmedcbr.org/archives/CBMTSIII/cbmts3-21.pdf>
- Rendon Von Osten j, Ortíz-Arana A, Guilhermino L, Soares AMVM. *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* 2005;58:627-36.
- Repetto M. Toxicología avanzada. Madrid: Díaz de Santos, S. A; 1995.
- Riviere JE. Dermal absorption/toxicity of organophosphates and carbamates. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 209-18.
- Robson AJ, Neal C. Regional water quality of the river tweed. *Sci Total Environ* 1997;194-195:173-92.
- Rodríguez-Fuentes G, Armstrong J, Schlenk D. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;69:446-71.
- Rodríguez-Fuentes G, Gold-Bouchot G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar Environ Res* 2004;58:505-9.
- Roex EWM, Keijzers R, Van Gestel CAM. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat Toxicol* 2003;64:451-60.
- Rohlman DS, Arcury TA, Quandt SA, Lasarev M, Rothlein J, Travers R, et al. Neurobehavioral performance in preschool children from agricultural and non-agricultural communities in Oregon and North Carolina. *Neurotoxicology* 2005;26:589-98.
- Rose RL, Hodgson E, Roe RM. Pesticides. En: Marquardt H, Schafer S, McClellan R, Welsch F, editors. *Toxicology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 663-97.

- Roth M, Richards RH, Sommerville C. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: A review. J Fish Dis 1993;16:1-26.
- Rupa DS, Reddy PP, Sreemannarayana K, Reddi OS. Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. Environ Mol Mutagen 1991;18:136-8.
- Sadik OA, Wanekaya AK, Andreescu S. Advances in analytical technologies for environmental protection and public safety. J Environ Monit 2004;6:513-22.
- Saglio P, Trijasse S, Azam D. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. Arch Environ Contam Toxicol 1996;31:232-8.
- Salama RB, Silberstein R, Pollock D. Soils characteristics of the bassendean and spearwood sands of the Gngara Mound (Western Australia) and their controls on recharge, water level patterns and solutes of the superficial aquifer. Water Air Soil Pollut: Focus 2005;5:3-26.
- Salem MH, Abo-Elezz Z, Abd-Allah GA, Hassan GA, Shaker N. Effect of organophosphorus (dimethoate) and pyrethroid (deltamethrin) pesticides on semen characteristics in rabbits. J Environ Sci Health 1988;23:279-90.
- Salles JB, Cunha Bastos VLF, Filho MVS, Machado OLT, Salles CMC, Giovanni de Simone S, Cunha Bastos J. A novel butyrylcholinesterase from serum of *Leporinus macrocephalus*, a neotropical fish. Biochimie 2006;88:59-68.
- Sanchez JC, Fossi MC, Focardi S. Serum "B" esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. Ecotoxicol Environ Saf 1997;37:45-52.
- Sánchez ME, Estrada IB, Martínez O, Martín-Villacorta J, Aller A, Morán A. Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. Chemosphere 2004;57:673-9.
- Sánchez-Hernández JC, Carbonell R, Henríquez A, Montealegre M, Gómez L. Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard *Gallotia galloti palmae* by pesticides: a field study. Environ Pollut 2004;132:479-88.
- Sanchez-Hernández JC, Walker CH. *In vitro* and *in vivo* cholinesterase inhibition in Lacertides by phosphonate- and phosphorothioate-type organophosphates. Pestic Biochem Physiol 2000;67:1-12.
- Sanderson DM, Edson EF. Toxicological properties of the organophosphorus insecticide dimethoate. Br J Ind Med 1964;21:52-64.

- Sankararamakrishnan N, Sharma AK, Sanghi R. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India. *Environ Int* 2005;31:113-20.
- Sapozhnikova Y, Bawardi O, Schlenk D. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere* 2004;55:797-809.
- Sarin S, Gill KD. Biochemical and behaviour deficits in adult rat following chronic dichlorvos exposure. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;59:1081-6.
- Satoh T, Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Biol Interact* 2006;162:195-211.
- Schulz R, Liess M. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquat Toxicol* 1999;46:155-76.
- Schulz R. Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens River, Western Cape, South Africa: Importance of a single event. *Water Res* 2001;35:1869-76.
- Schuntner CA, Roulston, WJ, Schnitzerling HJ. A mechanism of resistance to organophosphorous acaricides in a strain of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust J Biol Sci* 1968;21:97-109.
- Scopes RK. Protein Purification: Principles and Practice. New York: Springer-Verlag; 1982.
- Seino A, Kazuma T, Tan AJ, Tanaka H, Kono Y, Mita K, Shiotsuki T. Analysis of two acetylcholinesterase genes in *Bombix mori*. *Pestic Biochem Physiol* 2007;88:92-101.
- Senanayake N, Karalliedde L. Neurotoxic Effects organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *N Engl J Med* 1987;316:761-3.
- Serrano R, Lopez FJ, Hernández F, Peña JB. Bioconcentration of chlorpirifos, chlorfenvinphos and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 1997;59:968-75.
- Shahar E, Bentur Y, Bar-Joseph G, Cahana A, Hershman E. Extrapyrmidal parkinsonism complicating acute organophosphate insecticide poisoning. *Pediatr Neurol* 2005;33:378-82.
- Shaonan I, Xianchuan X, Guaonian Z, Yajun T. Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates. *Aquat Toxicol* 2004;68:293-9.

- Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* 2005;25:173-81.
- Sidell FR. Clinical effects of organophosphorus cholinesterases inhibitors. *J Appl Toxicol* 194;14:111-3.
- Sikka SC, Gurbuz N. Reproductive toxicity of organophosphate and carbamate pesticides. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate Compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 447-62.
- Silver A. *The biology of cholinesterase*. Amsterdam: Elsevier; 1974.
- Singh SR, Walters KFA, Port GR, Northing P. Consumption rates and predatory activity of adult and fourth instar larvae of the seven spot ladybirds, *Coccinella Septempunctata* (L), following contact with dimethoate residue and contaminated prey in laboratory arenas. *Biol Control* 2004;30:127-33.
- Smith MI, Elove E, Frazier WH. The Pharmacological action of certain phenol esters with special reference to the etiology of the so-called ginger paralysis. *Public Health Rep* 1930;45:2509-24.
- Smyth KA, Russell RJ, Oakeshott JG. A cluster of at least three esterase genes in *Lucilia cuprina* includes malathion carboxyl esterase and two other esterases implicated in resistance to organophosphates. *Biochem Genet* 1994;32:437-53.
- Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes Involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett* 2002;128:215-28.
- Solé M, Livingstone DR. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp Biochem Physiol* 2005;141:20-31.
- Solecki R, Niemann L, Gericke C, Chahoud. Dietary administration of dimethoate to the Japanese quail: reproductive effects and successful hatchability of eggs. *Bull Environ Contam Toxicol* 2001;67:807-14.
- Soliman SA, Farmer J, Curley A. Is delayed neurotoxicity a property of all organophosphorus compounds? a study with a model compound: parathion. *Toxicology* 1982;23:267-79.
- Steen RJCA, Van der Vaart J, Hiep M, Van Hattum B, Cofino WP, Brinkman UATH. Gross fluxes and estuarine behaviour of pesticides in the Scheldt estuary (1995-1997). *Environ Pollut* 2001;115:65-79.

- Stenersen J. Chemical pesticides: Mode of action and toxicology. Florida: CRC Press LLC; 2004.
- Straus DL, Chambers JE. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquat Toxicol* 1995;33:311-24.
- Sturm A, da Silva de Assis HC, Hansen PD. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar Environ Res* 1999;47:389-98. Corrección: *Mar Environ Res* 2000;49:95.
- Sturm A, Wogran J, Segner H, Liess M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. *Environ Toxicol Chem* 2000;19:1607-15.
- Suau P, López J. Contribución al estudio de la dorada, *Sparus aurata* L. *Inv Pesq* 1976;40:169-99.
- Sudakin DL, Mullins ME, Horowitz Z, Abshier V, Letzig L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *Clin Toxicol* 2000;38:47-50.
- Sultatos LG. Interactions of organophosphorus and carbamate compounds with cholinesterases. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p. 209-18.
- Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991;253:872-9.
- Szelenyi JG, Bartha E, Hollan SR. Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: An enzyme characteristic of T-cells. *Br R Haematol* 1982;50:241-5.
- Tang J, Rose RL, Chambers JE. Metabolism of organophosphorus and carbamates pesticides. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. New York: Academic Press; 2006. p.127-43.
- Taylor P, Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*: 1994;34:281-320.
- Taylor P. Anticolinesterasas. En: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. eds. *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 1996. p. 171-87.

- Teather K, Jardine C, Gormley K. Behavioral and sex ratio modification of japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to environmentally relevant mixtures of three pesticides. *Environ Toxicol* 2005;20(1):110-7.
- Timbrell JA. Introduction to toxicology. Florence: Taylor&Francis, Inc.; 2001.
- Tortelli V, Colares EP, Robaldo RB, Nery LEM, Pinho GLL, Bianchini A, Monserrat JM. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. *Chemosphere* 2006;65:560-6.
- Toutant JP, Massoulié J, Bon S. Polymorphism of pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* tissues: Comparative study of catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase. *J Neurochem* 1985;44(2):580-92.
- Tripathi PK, Singh A. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on reproduction and related enzymes of the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003;71:535-42.
- Tsuda T, Kojima M, Harada H, Nakajima A, Aoki S. Accumulation and excretion of fenthion, fenthion sulfoxide and fenthion sulfone by killifish (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol* 1996;113C(1):45-9.
- Turner APF. Biosensors. En: McGraw Hill Yearbook of science&tecnology. McGraw Hill, New York: 1999; p. 39-42.
- UNEP/FAO/PIC/INC.11/4. Inclusion of the chemical parathion in the interim prior informed consent procedure and adoption of the draft decision guidance document on parathion, 2004.
- Ural MS, Çalta M. Acute toxicity of dichlorvos (DDVP) to fingerling mirror carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull Environ Contam Toxicol* 2005;75:368-73.
- Ural MS, Köprücü SS. Acute toxicity of dichlorvos on fingerling european catfish, *Silurus glanis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006;76:871-876.
- USEPA. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Database System, 2007b. Version 4.0. [En línea] 2007. [Consultada 8 mayo 2009]. Disponible en: <http://www.epa.gov/ecotox/>.
- USEPA. *Ethyl parathion*: Revised human health risk assessment. Washington, D.C.: U. S. Government Printing Office; 1999.
- USEPA. Fifth Carcinogenicity peer review of dichlorvos. Tox Chem 328 PC Code 084001. Washington D. C.: U. S. Government Printing Office; 1996.
- USEPA. Interim Reregistration Eligibility Decision (IRED) Document for dimethoate. Washington D. C.: U. S. Government Printing Office; 2007a.

- Van Maele-Fabry G, Laurent C, Willems JL. Dichlorvos and carcinogenicity: a systematic approach to a regulatory decision. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;31:13-21.
- Varò I, Amat F, Navarro JC. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. *Aquat Toxicol* 2008;88:53-61.
- Varò I, Navarro JC, Amat F, Guilhermino L. Characterization of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* 2002;48:563-9.
- Varò I, Navarro JC, Amat F, Guilhermino L. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pestic Biochem Physiol* 2003;75:61-72.
- Varò I, Navarro JC, Nunes B, Guilhermino L. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *Aquaculture* 2007;266:87-96.
- Verma AK, Pal AK, Manush SM, Das T, Dalvi RS, Chandrachoodan PP, et al. Persistent sub-lethal chlorine exposure elicits the temperature induced stress responses in *Cyprinus carpio* early fingerlings. *Pestic Biochem Physiol* 2007;87:229-37.
- Villatte F, Schulze H, Schmid RD, Bachmann TT. A disposable acetylcholinesterase based electrode to detect anatoxi-a(s) in water. *Anal Bioanal Chem* 2002;372:332-6.
- Villani P. Allevamento larvale di orata (*Sparus aurata* L) riprodotta in condizioni artificiali di laboratori. *Arch Oceanogr Limnol* 1976;3 Suppl 18:78.
- Villatte F, Ziliani P, Marcel V, Menozzi P, Fournier D. A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 2000;67:95-102.
- Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, Tsaka S, Hejazi MJ, Ayountanti A, Hemingway J. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 2001;71:124-32.
- Vyas NB, Spann JW, Hulse CS, Gentry S, Borges SL. Dermal insecticide residues from birds inhabiting an orchard. *Environ Monit Assess* 2007;133:209-14.

- Walker CH, Thompson HM. Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. En: Mineau P, editor. Cholinesterase inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment. Vol II. New York: Elsevier; 1991. p. 1-18.
- Walker CH. Biochemical biomarkers in ecotoxicology-some recent developments. *Sci Total Environ* 1995;171:189-95.
- Walker CH. Organic Pollutants: An ecotoxicological perspective. London: CRC Press; 2001.
- Walker CH. The use biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998;40:65-70.
- Wallace KB, Herzberg U. Reactivation and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;92:307-14.
- Wallace KB, Kemp JR. Species specificity in the chemical mechanisms of organophosphorus anticholinesterase activity. *Chem Res Toxicol* 1991;4:41-9.
- Wang C, Murphy SD. Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 66:409-19.
- Weiss CM. 1961. Physiological effect of organic phosphorous insecticides in several species of fish. *Trans Am Fish Soc* 1961;90:143-52.
- Weiss CM. The determination of cholinesterase in the brain tissue of three species of fresh water fish and its inactivation in vivo. *Ecology* 1958;39:194-9.
- Williams RD, Boros LG, Kolanko CJ, Jackman SM, Eggers TR. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to the anticholinesterase pesticide isofenphos with mechanisms of leukemogenesis. *Leuk Res* 2004;28:947-58.
- Young JG, Eskenazi B, Gladstone EA, Bradman A, Pedersen L, Johnson C, et al. Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology* 2005;26:199-209.
- Zhang ZL, Hong HS, Zhou JL, Yu G. Occurrence and behaviour of organophosphorus insecticides in the river Wuchuan, Southeast China. *J Environ Monit* 2002;4:498-504.
- Zinkl JG, Lockhard WL, Kenny SA, Ward FJ. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. En: Mineau P, editor. Cholinesterase inhibiting insecticides. New York: Elsevier; 1991. p.233-54.

- Zinkl JG, Shea PJ, Nakamoto RJ, Callman J. Technical and biological consideration for the analysis of brain cholinesterase from rainbow trout. *Trans Am Fish Soc* 1987;116:570-3.
- Zohar Y, Harel M, Hassain S, Tandler A. Gilthead seabream (*Sparus aurata*). En: Bromage NR, Roberts, RJ, editors. *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell Science; 1995. p. 94-117.
- Zuin VG, Yariwake JH, Bicchi C. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. *J Chromatogr* 2003;985A:159-66.
- Zulin Z, Huasheng H, Xinhong W, Jianqing L, Weiqi C, Li X. Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong river estuary, China. *Mar Pollut Bull* 2002;45:397-402.

ANEXO

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES RELACIONADAS

Artículos:

- Arufe MI, Arellano JM, Albendín G, Sarasquete C. Toxicity of parathion on embryo and yolk-sac larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Effects on survival, cholinesterase and carboxylesterase activity [en prensa]. Environ Toxicol.
- Arufe MI, Arellano JM, García L, Albendín G, Sarasquete C. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: Characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. Aquat Toxicol 2007;84:328-336.

Congresos:

- Albendín G, Arellano JM, Manuel-Vez MP, Arufe MI. Estudio de la relación entre la actividad colinesterasa en tejido cerebral y muscular de la dorada (*Sparus aurata*) y diversos parámetros morfométricos y de crecimiento. XIV Seminario Ibérico de Química Marina, Cádiz (España), 2008.
- Arellano JM, López-Jiménez M, Albendín G, Arufe MI, Sarasquete C. Estudio de las alteraciones histológicas en larvas de dorada (*Sparus aurata*) expuestas a concentraciones subletales de diferentes organofosforados. XIV Seminario Ibérico de Química Marina, Cádiz (España), 2008.
- Albendín G, Arellano JM, Arufe MI, Manuel-Vez MP. Paraoxonasa vs organofosforados. I. Determinación de la actividad paraoxonasa, K_M y V_{max} en el suero de *Sparus aurata*. XIV Seminario Ibérico de Química Marina, Cádiz (España), 2008.
- Albendín G, Arellano JM, Manuel-Vez MP, Arufe MI. Sensibilidad de las colinesterasas cerebral y muscular de la dorada (*Sparus aurata*) al insecticida organofosforado diclorvos. XVII Congreso Español de la Asociación Española de Toxicología (AETOX). Santiago de Compostela (España), 2007.

- Albendín G, Arellano JM, Manuel-Vez MP, Arufe MI. Sensitivity of brain acetylcholinesterase activity to parathion insecticide in the seabream (*Sparus aurata*). XVII Congreso SETAC. Porto (Portugal), 2007.
- Albendín G, Arellano JM, Manuel-Vez MP, Sarasquete C, Arufe MI. Acetylcholinesterase biomarker in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: Study of the influence of fish size, age and weight. XVII Congreso SETAC. Porto (Portugal), 2007.
- Albendín G, Arufe MI, Manuel MP. Bioacumulación de pesticidas organofosforados (OFS) en la dorada (*Sparus aurata*). I. Optimización de un método fluorimétrico para la determinación de OFS en extractos orgánicos. Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica, Cádiz (España), 2006.
- Albendín G, Arufe MI, Arellano JM, Manuel MP. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*)". VI Congreso Ibérico y III Iberoamericano de Contaminación Ambiental y Toxicología (CITAC), Cádiz (España), 2005.
- Arufe MI, Arellano JM, Albendín G, Sarasquete C. Acute toxicity and cholinesterase inhibition in *Sparus aurata* embryos and larvae exposed to parathion. VI Congreso Ibero y III Iberoamericano de Contaminación Ambiental y Toxicología (CITAC), Cádiz (España), 2005.
- Albendín G, Arufe MI, Arellano JM, Manuel MP. Inhibición de la acetilcolinesterasa cerebral de la dorada (*Sparus aurata*) mediante el insecticida organofosforado azinfosmetil. XVI Congreso Español de Toxicología (AETOX), Cáceres (España), 2005.
- Arufe MI, Arellano JM, Albendín G, Sarasquete C. Efectos a corto plazo del clorpirifos sobre la supervivencia y la actividad colinesterásica de larvas endotróficas de dorada". XVI Congreso Español de Toxicología (AETOX), Cáceres (España), 2005.

